

Über das Glycoprotein Kollagen:
UNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNGSWEISE
DER KOHLENHYDRAT-KOMPONENTE
VERSCHIEDENER KOLLAGENE

Axel Stemberger

1972



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553803_0024

Über das Glycoprotein Kollagen:

UNTERSUCHUNGEN ZUR BINDUNGSWEISE DER KOHLENHYDRAT-
KOMPONENTE VERSCHIEDENER KOLLAGENE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von

Axel Stemberger
aus
München

M ü n c h e n 1 9 7 2



1. Berichterstatter: Prof. Dr.K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr.Th. Severin

Tag der mündlichen Prüfung: 5. Juli 1972

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung in München in der Zeit von Oktober 1969 bis Dezember 1971 durchgeführt.

Meinen verehrten Lehrern,

Herrn Professor Dr. Klaus Kühn
und

Herrn Professor Dr. Theodor Severin

möchte ich für Ihre Unterstützung danken.

Herrn Professor Dr. K. Kühn danke ich herzlich für das mir entgegengebrachte Wohlwollen und die guten Arbeitsbedingungen.

Herrn Dr. Arnold Nordwig

möchte ich für viele Hinweise, Anregungen und die Diskussion zu dieser Arbeit sehr danken.

Herrn Dr. P. Fietzek danke ich für die Zurverfügungstellung der $\alpha 2$ Peptide und die fachliche Aussprache.

Herrn Priv. Doz. Dr. W. Schäfer vom Max-Planck-Institut für Biochemie habe ich für die Bereitstellung eines Gaschromatographen sehr zu danken.

Fräulein J. Menge danke ich für die freundliche technische Mithilfe.

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
EINLEITUNG	1
AUFGABENSTELLUNG	5
ERGEBNISSE	8
A. Charakterisierung der Kohlenhydrate und der Kohlenhydrat-Protein-Bindung in Actinocol, Fasciocol und Helicol	8
I. Charakterisierung des Kohlenhydratanteils	8
1. Präparation der drei Invertebratenkollagene	8
2. Papierchromatographische Identifizierung der proteingebundenen Kohlenhydrate	9
3. Quantitative Hexosenbestimmung	11
a) Vergleich von Orcin- und Anthronmethode	11
b) Abhängigkeit des Kohlenhydrat-Gehaltes vom Reinheitsgrad der Kollagene	13
4. Qualitative und quantitative Erfassung der Kohlenhydrate mit gaschromatographischen Methoden	13
5. Diskussion	19
II. Charakterisierung des Typs der Kohlenhydrat-Protein-Bindung	20
1. Isolierung der Glycopeptidfraktionen I und II	20
2. Sind die Kohlenhydrate der Invertebratenkollagene an Serin bzw. Threonin gebunden ?	22

	<u>Seite</u>
3. Sind die Kohlenhydrate der Invertebraten- kollagene an Hydroxylysin, gebunden ?	26
a) Vorversuche mit der alkalisch hydrolysierten Glycopeptidfraktion II	26
b) Partielle Säurehydrolyse der Glycopeptid- fraktion IIa	29
4. Quantitative Bestimmung der an Hydroxylysin gebundenen Kohlenhydrate	30
a) Perjodatoxydation der nicht glycosylierten Hydroxylysinreste	32
b) Bestimmung von Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl mit dem Aminosäureanalysator	34
5. Untersuchung der Glycopeptidfraktion I	37
6. Diskussion	40
 B. Hydroxylysin-gebundene Kohlenhydrate in Vertebraten- kollagen	 45
1. Bisher bekannte Ergebnisse	45
2. Kohlenhydratgehalt von Kalbs- und Rattenhaut- kollagen	47
a) Kohlenhydratgehalt der α 1-Kette von Kalbs- hautkollagen	47
b) Kohlenhydratgehalt der α 2-Kette von Ratten- und Kalbshautkollagen	48
3. Diskussion	50

EXPERIMENTELLER TEIL		53
Versuch 1	Präparation der Kollagene	53
	a) Actinocol-PLK	53
	b) Fasciocol-PLK	54
	c) Helicol-Gelatine	54
Versuch 2	Säurehydrolysen zur Abspaltung protein- gebundener Kohlenhydrate	55
	a) für Pentosen	53
	b) für Hexosen	55
	c) für Hexosamin	56
Versuch 3	Identifizierung der Zucker	56
	a) Papierchromatographie	56
	b) Dünnschichtchromatographie	57
Versuch 4	Quantitative Hexosenbestimmung	57
	a) Anthronmethode	57
	b) Orcinmethode	57
	c) Automatische Kohlenhydrat-Bestimmung mit Orcin am Technicon-Auto-Analyzer	58
Versuch 5	Gaschromatographische Analyse proteinge- bundener Kohlenhydrate	59
Versuch 6	Proteolytischer Abbau der Invertebraten- kollagene	64
Versuch 7	Gelchromatographie	65
	a) an Sephadex G-50, G-25 und G-15	65
	b) an P2	66

	<u>Seite</u>
Versuch 8 β -Eliminierung und nachfolgende Reduktion	66
Versuch 9 Abspaltung reduzierender Saccharide aus alkalilabilen Glycoproteinen	67
Versuch 10 Qualitativer Nachweis von Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl	68
a) Papierchromatographie	68
b) Hochspannungselektrophorese	68
Versuch 11 Ermittlung der Saccharid-Sequenz der Glycopeptidfraktion IIa	69
a) partielle Säurehydrolyse	69
b) enzymatische Gal- und Glc-Bestimmung	69
Versuch 12 Perjodatoxydation von proteingebundenem Hyl	71
Versuch 13 Proteinhydrolysen	72
a) mit 6 n HCl	72
b) mit 2 n NaOH	72
Versuch 14 Quantitative Aminosäure-Analyse	73
a) Bedingungen für die Analyse sauer oder alkalisch hydrolysierter Kollagene	73
b) Verfahren zur quantitativen Berechnung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und freiem Hyl	74
ZUSAMMENFASSUNG	76
LITERATURVERZEICHNIS	78
LEBENS LAUF	

E I N L E I T U N G

Das Faserprotein Kollagen ist Hauptbestandteil des Bindegewebes aller Tiere. Als Skleroprotein zeichnet es für die Festigkeit von Haut, Sehne, Knorpel, Zähnen und Knochen verantwortlich, es hat aber auch andere Funktionen, z.B. erlaubt es den Austausch von Stoffwechselprodukten in Basalmembranen.

Die native Kollagenmolekel hat ein Molgewicht von etwa 300.000. Ihre Struktur ist die eines steifen Stäbchens mit einer Länge von $2900 \text{ \AA}$ bei einem Durchmesser von $14,5 \text{ \AA}$. Sie besteht aus drei linksgewundenen Polypeptidketten, sogenannten α -Ketten (Untereinheiten zu je etwa 1040 Aminosäuren), die nach der Polyprolin II-Struktur von Rich und Crick (1961) und dem Modell von Ramachandran und Sasisekharan (1961) um eine gemeinsame Achse zu einer Rechtsschraube verdreht und durch Wasserstoffbrücken verfestigt sind. Jede dritte Aminosäure ist aus Raumerfüllungsgründen Glycin.

Kollagen ist wie jedes Protein den Prozessen der Evolution unterworfen. Niedrig entwickelte tierische Organismen sollen für die Determinierung der Kollagenuntereinheiten nur ein Gen besitzen (Pikkarainen und Kulonen, 1967, 1969). Experimentelle Evidenz für diese Vorstellung wurde für das Kollagen der Seeanemone gefunden (Nordwig und Hayduk, 1969; Nordwig und Hieber, unveröffentlichte Ergebnisse). Bei höher entwickelten Tieren dagegen ist das Kollagenmolekül aus zwei oder sogar drei verschiedenen α -Kettentypen aufgebaut. Knorpelkollagen dagegen weist noch teilweise den aus drei identischen Untereinheiten aufgebauten Molekültyp auf (Miller, 1971); auch das Basalmembran-Kollagen besteht aus nur einem α -Kettentyp (Kefalides, 1971).

Von Evolutionsprozessen unbeeinflusst blieben dagegen die Tertiär- und Quartärstruktur des Kollagens, wie elektronenmikroskopische

Untersuchungen sowie Röntgenkleinwinkel- und -weitwinkelaufnahmen erkennen lassen (Nordwig und Hayduk, 1969; Traub, Stemberger und Nordwig, unveröffentlichte Ergebnisse).

Die Kollagen- α -Ketten werden an den Polyribosomen der Fibroblasten synthetisiert. Nicht unmittelbar genetisch determiniert sind anschließende chemische Veränderungen. Hydroxylysin (Hyl), bis jetzt nur in Kollagen nachgewiesen, entsteht wie Hydroxyprolin (Hyp) aus den entsprechenden peptidgebundenen, unhydroxylierten Aminosäuren durch Lysin- und Prolinhydroxylase (Prockop, 1970).

In einem weiteren enzymatischen Schritt werden einige Lysin- und Hydroxylysin- ϵ NH₂-Gruppen von Lysinoxydase zu Aldehydgruppen oxydiert, die mit den Lysin- und Hydroxylysinseitenketten anderer Untereinheiten sogenannte Schiff-Basen ausbilden (Bailey et al., 1970). Die so quervernetzten Kollagenmoleküle lagern sich, um ein Viertel ihrer Länge versetzt, zu Fibrillen zusammen.

Peptidgebundenes Hyl ist ferner alleiniger Akzeptor für die Übertragung von Galaktosyl- bzw. Glucosylresten durch spezifische Enzyme (Spiro und Spiro, 1971a, 1971b, 1971c).

Daß Kollagen ein Glycoprotein ist, wurde schon in den dreißiger Jahren erkannt. Den Gewichtsanteil von etwa einem Prozent Glucose und Galaktose als integrierenden Bestandteil hochgereinigten Wirbeltierkollagens entdeckten schon Graßmann und Schleich (1935), wohingegen die morphologisch verschiedenen Kollagene der Basalmembranen sowie die Invertebratenkollagene bis zu 12% Zucker enthalten (Gross, 1958); neben Glucose und Galaktose werden hier Mannose, Pentosen und Hexosamine, wie Tabelle 2 zeigt, beschrieben. Die Natur der chemischen Bindung in Vertebratenkollagenen erforschten die Arbeitsgruppen Cunningham (1966, 1970) und Spiro (1967a, 1969). Galaktose ist β -glycosidisch an die Hydroxylgruppe des Hyl gebunden, vicinal zur freien

ϵ -Aminogruppe. An das Galaktosylhydroxylysin (Gal-Hyl) kann α -glycosidisch Glucose gebunden sein. Struktur und rationelle Nomenklatur des Glucosylgalaktosylhydroxylysin (Glc-Gal-Hyl) zeigt Abb. 1.

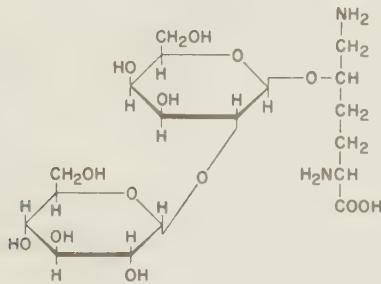


Abb. 1: Struktur von Glc-Gal-Hyl

Rationelle Nomenklatur: 2-O- β -D-Glucopyranosyl-O- α - β -D-Galaktopyranosyl-Hydroxylysin (nach Spiro)

Vertebratenkollagene variieren hinsichtlich der Hydroxylysin-gebundenen Zucker beträchtlich. Bei Basalmembranen liegen ausschließlich Disaccharideinheiten vor; die in großen Mengen vorhandenen Hydroxylysinreste sind damit zu etwa 80% belegt. In Haut- und Sehnenkollagen ist Hydroxylysin eher selten. Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl können bei einer höchstens 26prozentigen Glycosylierung dieser Aminosäure äquimolar verteilt sein, (Spiro, 1970).

Am Cuticulakollagen des Regenwurms (Hydroxylysin fehlt diesem Protein, Galaktose ist alleinige Kohlenhydrat-Komponente) entdeckten Lee und Mitarbeiter (1968, 1969) den für andere Glycoproteine bereits bekannten Typ der Serin- und Threonin-O-Glycoside, die im Alkalischen, allerdings nur bei peptidgebunde-

nen Amino- und Carboxylgruppen der β -Eliminierung unterliegen. Die anomere Konfiguration der mittels eines Nucleophils abgespaltenen Galaktosedi- und trisaccharideinheiten gibt Abb. 2 wieder.

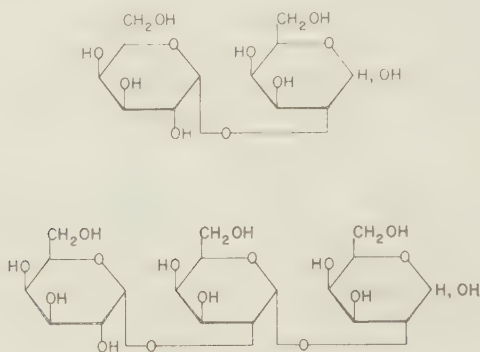


Abb. 2: Struktur der an Ser und Thr gebundenen Galaktosedi- und trisaccharide

Rationelle Nomenklatur:

O- α -D-Galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -D-

Galaktopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)-D-Galaktose (nach Lee)

Spiro (1967b) diskutiert für Basalmembranenkollagen im Zusammenhang mit einem Heteropolysaccharid (so genannt, wenn mehr als ein Kohlenhydrattyp vorhanden ist) die z.B. in Ovalbumin und IgG-Immunglobulin vorkommende N-glycosidische Bindung des C₁-Atoms von N-Acetylhexosamin mit Asparagin.

Der letzte der bisher bekannten Bindungstypen bei Glycoproteinen findet sich nur in den Zellwandproteinen von Pflanzen. An Hydroxyprolin sind hier noch nicht näher charakterisierte Arabinoseeinheiten fixiert (Lamport, 1969). Obwohl Hydroxyprolin in Kollagenen aller Species sehr häufig ist, gibt es für solche Glycoside keinerlei Hinweise.

A U F G A B E N S T E L L U N G

Die Bindungsweise der Zucker an Vertebratenkollagene ist weitgehend aufgeklärt; es lag deshalb nahe, analoge Untersuchungen an den in unserem Arbeitskreis gut charakterisierten Invertebratenkollagenen des Leberegels, der Seeanemone und der Schnecke vorzunehmen, deren Kohlenhydratgehalte und Aminosäurezusammensetzung im Vergleich mit Tieren verschiedenster Entwicklungsstufen die Tabellen 1 und 2 angeben.

Es galt primär, die individuellen Monosaccharide qualitativ und quantitativ zu erfassen sowie den Einfluß von Verunreinigungen abzuschätzen.

Es sollte dann versucht werden, die Art der Bindung der Kohlenhydrate an die Peptidketten aufzuklären und die beteiligten Komponenten quantitativ zu bestimmen. Dabei kommen, soweit bis jetzt bekannt ist, entweder Hydroxylysin oder Serin und Threonin als Bindungspartner für die Kohlenhydrate in Frage.

In Zusammenarbeit mit einem Arbeitskreis unseres Hauses, der sich mit der Primärstrukturaufklärung des Kollagens beschäftigt, sollten außerdem isolierte α -Ketten und Bruchstücke des Kalb- und Rattenkollagens auf hydroxylysingebundene Kohlenhydrate untersucht werden.

Tab. 1: Aminosäurezusammensetzung verschiedener Vertebraten- und Invertebratenkollagene
(Angaben in Mole/1000 Mole Aminosäuren)

	Kalbshaut- kollagen (a)	Kollagen aus Basalmembran (Humaniere) (b)	Kollagen aus Regenwurm- cuticula (c)	Actinocol (d)	Fascinocol (d)	Helicol (e)
Gly	335	310	341	309	305	322
Ala	107	33	102	66	57	65
Val	22	29	18	31	35	26
Leu	27	54	29	34	31	28
Ile	12	30	17	23	26	13
Phe	13	27	5	8	7	9
Met	5	10	Spur	5	18	1
Pro	124	61	10	75	111	101
4-Hyp	91	130	162	77	95	91
3-Hyp	Spuren	11	-	15	0	-
Tyr	4	6	2	4	5	6
Ser	34	37	47	38	32	50
Thr	15	23	84	38	25	28
Asp	48	51	66	79	64	74
Glu	74	84	83	88	91	111
His	5	14	1	3	5	3
Lys	25	10	17	19	17	10
Hyl	7	46	-	28	26	12
Arg	50	33	23	62	48	54

(a) SLK; Hieber (1970)

(b) PLK; Kefalides (1971)

(c) SLK; Lee und Lang (1968)

(d) SLK; Nordwig und Hayduk (1969)

(e) durch Alkali- und Enzymbehandlung in Lösung
gebracht und gereinigt; Hieber (1970)

Tab. 2: Kohlenhydratgehalte verschiedener Vertebraten- und Invertebratenkollagene
(Angaben in Gew.%)

mg/100 mg Trockengewicht					
Literatur	Hexosen	Pentosen	Hexos-amin	Papierchromato-graphisch identifiziert	
Kalbshaut (SLK)	a 0,4	-	-	Glc, Gal	
Ichthyocol (SLK)	b 0,3	-	-	Glc, Gal	
Nierenbasal-membran	b 10	0,2	1,7	Glc, Gal, Man, Fuc	
Augenlinse	b 10	0,2	1,8	Sialinsäure, Glc-N, Gal-N	
Regenwurm (SLK)	c 8,8	-	-	Gal	
Schwamm (Gelatine)	d 11,0	2,7	1,8	Glc, Gal, Man, Fuc	
Seegurke (Gelatine)	d 4,4	0,5	0,6	Ara, Uronsäuren,	
Qualle (Gelatine)	d 6,0	0,9	0,9	Glc-N, Gal-N	
Seeanemone (SLK)	e 14,1				
Leberegel (SLK)	e 12,1				
Schnecke (lös.Koll.)	f 12,1				

a Kühn et al (1964)

b Spiro (1969)

c Lee u.Lang (1968)

d Gross (1958)

e Nordwig u. (1969)

f Hayduk (1970)

Hieber (1970)

E R G E B N I S S E

A. Charakterisierung der Kohlenhydrate und der Kohlenhydrat-Protein-Bindung in Actinocol, Fasciocol und Helicol

I. Charakterisierung des Kohlenhydratanteils

1. Präparation der drei Invertebratenkollagene

Um größere Mengen monomeres Invertebratenkollagen zu isolieren, kann man nicht wie bei Vertebratengeweben mit Neutralsalzlösungen von physiologischem pH NLK oder mit Citratpuffer SLK extrahieren. Unlösliches, d.h. quervernetztes Vertebratenkollagen kann durch Abbau mit Pepsin in essigsaurem Milieu als natives Kollagen in Lösung gebracht werden. Dieses pepsinlösliche Kollagen (PLK) ist im Vergleich mit SLK oder NLK um die wenigen Aminosäuren der nichthelicalen Bereiche an den Molekülenden kürzer, von denen die Quervernetzungen ausgehen.

Wie Nordwig und Hayduk (1969) zeigten, ist die Methode auch zum Abbau von Kollagen aus der von Ekto- und Entoderm befreiten Mesogloea der Seeanemone (Actinia equina) und dem Leberegel (Fasciola hepatica) geeignet.

Vom Fuß der Gartenschnecke (Helix pomatia) erhält man dagegen mit dieser Methode weniger gut definiertes Kollagen. Hochgereinigtes, wenn auch molekular nicht intaktes Kollagen der Schnecke läßt sich durch Gelatinisierung gewinnen.

Die drei Kollagene, im folgenden als Actinocol-PLK, Fasciocol-PLK und Helicol-Gelatine bezeichnet, werden durch Umfällen gereinigt, bis der Faktor

$$F = \frac{\text{mg N}}{\text{mg 4-Hyp}}$$

einen konstanten Wert erreicht, der wegen differenter 4-Hydroxyprolingehalte einzelner Kollagene variiert (siehe Versuch 1).

2. Papierchromatographische Identifizierung der protein- gebundenen Kohlenhydrate

Glycoproteine enthalten Kohlenhydrate, die kovalent an die Seitenketten von Aminosäuren (Asn, Hyl, Hyp, Ser, Thr) der Peptidkette gebunden sind (Spiro, 1970). Die Freisetzung der einzelnen Monosaccharide geschieht bei verschiedenen hydrolytischen Bedingungen, da die Stabilität der Glycosidbindungen, etwa die Empfindlichkeit gegenüber Säure, variiert. Um Kohlenhydrat-Proteinreaktionen einzuschränken, werden nur 1-2 mg Protein pro ml Hydrolysemittel verwendet. Ionen, geladene Zucker, Aminosäuren und Peptide werden nach der Hydrolyse an Kationen- und Anionen-Austauschersäulen entfernt.

Tab. 3: Schematische Darstellung der nach verschiedenen Hydrolysemethoden papierchromatographisch identifizierter Kohlenhydrate (genaue Versuchsangaben siehe Versuche 2 und 3; die Größe bzw. Intensität der Flecken ist mit + bis +++ angegeben)

	2n HCL		0,1 n HCL			Dowex 50-X4			
	4 h, 100°C		6 h, 100°C			24 h, 100°C			
	Glc	Gal	Glc	Gal	Fuc	Glc	Gal	Di	*
Actinocol-PLK	+++	+++	+++	+	+	+++	+++	++	
Fasciocol-PLK	+++	+++	+++	+	-	+++	+++	++	
Helicol-Gelatine	+++	+++	++	±	±	+++	+++	++	

* "Disaccharid" , wird im Text erläutert

Die Methylpentose L-Fucose wird durch Säuren leicht zerstört. Da sie aber gewöhnlich die periphere Position der Glycoproteine besetzt, genügen schon milde Hydrolysebedingungen zu ihrer Abspaltung. Für die einzelnen Kollagene ergaben sechsstündige Hydrolysen befriedigende Ergebnisse.

Zur Abspaltung peptidgebundener neutraler Hexosen hat sich die Hydrolyse mit 2 n HCl, 4-8 Stunden bei 100°C, bewährt. Hier besteht die Gefahr, daß an N-Acetylhexosamin gebundene, neutrale Kohlenhydrate säurestabile Oligosaccharide ergeben, wenn der Spaltung glycosidischer Bindungen eine Entacetylierung der Hexosamine vorausgeht (Spiro, 1966).

Werden Glycoproteine mit der wässrigen Aufschlammung eines Kationenaustauschers hydrolysiert (18-30 Stunden bei 100°C; es eignen sich vor allem schwach vernetzte Harze wie Dowex 50-X4, um Peptide oder Aminosäuren zu binden), so bleibt das Hydrolysat im Gegensatz zur normalen Säurehydrolyse nahezu farblos, auch entfällt der Entsalzungsschritt.

Die entsprechenden Flecken von Glucose und Galaktose erschienen nach dem Besprühen des Papierchromatogramms mit 0,1 m p-Anisidinphthalat. Es tauchte aber ein weiterer Fleck auf, dessen Rf-Wert in etwa dem von Lactose entsprach. Er wird daher als "Disaccharid" bezeichnet; dieses könnte entweder als solches vom Protein abgespalten worden sein bzw. Bruckstück eines Oligosaccharids sein.

Auch bei der dünnenschichtchromatographischen Untersuchung auf Celluloseplatten erscheinen nach Hydrolyse mit 2 n HCl (4 Stunden) nur Galaktose und Glucose.

Verglichen mit neutralen Hexosen sind Hexosamine wesentlich säurestabiler. Geeignete Hydrolysebedingungen sind 4 n HCl, 4-8 Stunden bei 100°C. In allen bisher bekannten Glycoproteinen sind die Hexosamine N-acetyliert, verlängerte Hydrolysezeiten können die schon erwähnten säurestabilen Reversionssaccharide bilden, hingegen wirkt die Hydrolyse mit HCl höherer Molarität

zerstörend. Von den neutralen Kohlenhydraten werden sie durch Absorption und Elution an Kationenaustauschern wie Dowex 50-X4 getrennt, gleichzeitig verbleiben einige, wenn auch nicht alle Aminosäuren und Peptide des Hydrolysates am Harz.

Papier- und Dünnschichtchromatographie ergaben aber für die drei Invertebratenkollagene keinerlei positive Hinweise auf Hexosamine.

Diese Versuchsreihe läßt sich also wie folgt zusammenfassen: In Actinocol-PLK, Fasciocol-PLK und Helicol-Gelatine wurden mit konventionellen Untersuchungsmethoden Galaktose und Glucose gefunden, in Actinocol auch Fucose, Hexosamine jedoch nicht. Glucose sitzt, wie die Hydrolysen mit 0,1 n HCl vermuten lassen, an der äußeren, leichter zugänglichen Stelle eines Glycosides.

3. Quantitative Hexosenbestimmung

a) Vergleich von Orcin- und Anthronmethode

Die an Invertebratenkollagene gebundenen Hexosen bestimmten Nordwig und Hayduk (1969) und Hieber (1970) quantitativ mit der Anthronmethode nach Yemm und Willis (1954), modifiziert von Hörmann und Gollwitzer (1962).

Um etwaige methodische oder kollagenbedingte Fehler auszuschließen, die entweder zu hohe oder zu niedere Hexosewerte ergeben könnten, wurden mit der Orcinmethode (Winzler, 1955) Kontrollbestimmungen durchgeführt.

Die chemischen Vorgänge dieser quantitativ auswertbaren Farbtteste sind nur teilweise bekannt (Hörmann und Siddiqui, 1968) Hexosen werden durch die im Test verwendete 70% Schwefelsäure vom Peptid oder Protein abgespalten und wegen der starken Protonenkonzentration (Versuchsbedingungen siehe Versuch 4) dehydratisiert, im wesentlichen zu Chromogenen, die sich von

Hydroxymethylfurfurol und einem unbekannten C_3 -Körper ableiten. Mit Anthron kondensieren diese Verbindungen zu einer Reihe ähnlicher Farbstoffe, deren Absorptionsmaximum bei 625 m μ liegt; die farbigen Reaktionsprodukte der Orcinreaktion werden bei 520 m μ colorimetriert. Aminosäuren stören die Reaktion nicht.

Eine Ausnahme macht Tryptophan, das mit den Säurespaltprodukten ebenfalls Chromophore bildet; es fehlt allerdings in Kollagenen vollständig.

Tab. 4: Hexosebestimmung nach der Anthron- und Orcinmethode
(Versuchsbedingungen siehe Versuch 4)

	Hexosegehalt (Gew.%)	
	Anthronmethode (Glc als Standard)	Orcinmethode (Gal als Standard)
Actinocol	10,8	10,5
Fasciocol	11,9	11,5

Wie Tab. 4 zeigt, ergeben beide Methoden nahezu identische quantitative Hexosenwerte, was in Einklang mit den an anderen Proteinen gemachten Erfahrungen von Hörmann und Gollwitzer (1962) steht.

Für Routineuntersuchungen, wie das Austesten der Eluate von Sephadex-Trennungen, ist die Anthronmethode am Technicon-Auto-Analyzer aber apparativ zu aufwendig; es wurde daher mit der Orcinmethode gearbeitet. Zu diesem Zweck wurde in Anlehnung an Judd und Cunningham (1962) ein analytisches Verfahren entwickelt, das unter Versuch 4 c angegeben ist.

b) Abhängigkeit des Kohlenhydrat-Gehaltes vom Reinheitsgrad der Kollagene

Kohlenhydratverunreinigungen beeinflussen den Reinheitsfaktor (mg N/mg 4-Hyp) von Kollagen-Präparationen nicht, können also mit diesen Bestimmungen nicht erfaßt werden. Es war aber durchaus vorstellbar, daß die nur durch Umfällen gereinigten Kollagene noch Fremd-Kohlenhydrate enthielten. Das sollte mit säulenchromatographisch gereinigtem Material, am besten mit einer isolierten α -Fraktion zu prüfen sein.

Nowack (unveröffentlichte Ergebnisse) gewinnt solche Präparate durch Gelchromatographie von Actinocol-PLK an Agarose 1,5 m und stellt eine Probe für die vorliegenden Untersuchungen zur Verfügung. Es wurden 7 Gew.% Hexosen (Anthrone-Methode) in der α -Fraktion gefunden, also weniger als mit der gleichen Methode in Actinocol-PLK. Die Tatsache, daß hohe Hexosegehalte integrierende Bestandteile der drei Invertebratenkollagene sind, wird durch dieses Ergebnis aber weiter untermauert.

4. Qualitative und quantitative Erfassung der Kohlenhydrate mit gaschromatographischen Methoden

Viele bekannte Glycoproteine sind, was den Kohlenhydratanteil betrifft, heterogen. Hexosen, Pentosen, Uronsäuren, Hexosamine und die Sialinsäure werden daher quantitativ mit gruppenspezifischen colorimetrischen Verfahren ermittelt. Störungen durch andere Kohlenhydrate sind meist die Regel. Auch optimale Testergebnisse ermitteln nur die Gewichtsanteile der ganzen Gruppe, sagen jedoch nichts über die quantitative Verteilung der einzelnen Kohlenhydrate aus. Mit Hilfe der zeitlich aufwendigen präparativen Papierchromatographie ist eine Bestimmung möglich, es existieren aber relativ große Fehlermöglichkeiten. Eine Technik, mit der die einzelnen Kohlenhydrate gleichzeitig

identifiziert und quantitativ bestimmt werden können, hat daher beträchtliche Vorteile.

Glycoproteine waren wegen ihres Vorkommens und ihrer Funktion in Plasmaproteinen, Hormonen, Enzymen und Membranen in den letzten 10 Jahren Objekt gesteigerter Anstrengungen bei der biochemischen und medizinischen Forschung. So war es nur natürlich, als die Gaschromatographie der Kohlenhydrate einen befriedigenden Stand erreichte, diese Methode auch für Untersuchungen über Glycoproteine einzusetzen. In einer Reihe von Publikationen der letzten Jahre wurde dieses Problem angegangen, dabei wird in allen Verfahren nach folgendem Schema operiert:

Die Kohlenhydrate werden

- a) durch saure Hydrolyse vom Protein abgespalten,
- b) in flüchtige Verbindungen umgesetzt und
- c) in den Gaschromatographen eingespritzt und an verschiedenen stationären und mobilen Phasen getrennt.

Zur gaschromatographischen Bestimmung der Kohlenhydrate in Actinocol und Fasciocol wurde eine von Clamp et al. (1967, 1970) entwickelte Methode benützt. Helicol-Gelatine, ein molekular nicht einheitliches Material, wurde in diese Untersuchungen nicht einbezogen.

Die Abspaltung der Kohlenhydrate aus den Invertebratenkollagenen erfolgt mit einmolarer methanolischer Salzsäure. Nach Testversuchen der Autoren tritt bei Beachtung der vorgeschlagenen Reaktionsparameter nämlich Molarität 0,2 - 1,0 und Hydrolysezeit 6 - 24 Stunden, keine Zerstörung ein (genaue Versuchsdurchführung siehe Versuch 5). Dies hat einige Vorteile gegenüber der wässrigen Säurehydrolyse. Wechselwirkungen der Zucker mit den Aminosäuren nach dem Typ der Maillardreaktion bleiben gering, da die reduzierenden Zucker unter den Hydrolysebedingungen zu Methylglycosiden acetalisieren. Außerdem werden einige Isomerenpeaks der Mannose und Galaktose als Methylglycoside

leichter getrennt (siehe unten).

Nach dem Neutralisieren mit Silbercarbonat schließt sich ein Re-N-Acetylierungsschritt an, da methanolische Salzsäure die N-Acetyl-Hexosamine eines Glycoproteins teilweise zu freien Hexosaminen hydrolysiert.

Im Gesamthydrolysat werden die Kohlenhydratglycoside mit dem Silylierungsgemisch Trimethylchlorsilan (TMS), Hexamethyldisilazan (HMDS) in Pyridin (1:1:5) zu unpolaren per-Trimethylsilyläthern umgesetzt. Diese Reaktion läuft bei Zimmertemperatur in weniger als 30 min quantitativ ab - ein großer Vorteil gegenüber den O-Methyl-Äthern oder O-Acetylestern. Nur die Silyläther der Hexosamine sind gegenüber Luftfeuchtigkeit sehr instabil, ein Extraktionsschritt nach dem Trocknen mit unpolaren Lösungsmitteln wie Heptan entfällt somit.

Zur gaschromatographischen Trennung der TMS-Kohlenhydratglycoside eignen sich im allgemeinen nur Glassäulen, da Metalle Umwandlungen und Zerstörung katalysieren. Als Füllung dient Chromosorb W (HP), 80-100 mesh, mit der stationären Phase 3,8% SE30, einen Dimethylsilicon, nach der "solution coating"-Technik belegt. Etwa 2-8 µl der silylierten Hydrolysate werden in den Gaschromatographen gespritzt, die Trennung erfolgt zeitprogrammiert mit einem Temperaturgradienten von 0,5°C/min. Um Störungen durch das Lösungsmittel zu vermeiden, beträgt die Starttemperatur 140°C.

Wie zu erwarten war, zeigen die verschiedenen Monosaccharide Peaks, die den α - oder β -Anomeren der furanoiden bzw. pyranoiden Formen entsprechen (Abb. 3). Die theoretisch möglichen vier Isomeren entstehen nicht alle, da Hydrolysebedingungen und Silylierungsgemisch einzelne Formen begünstigen. Zahl, Reihenfolge und Trennung der Kohlenhydratisomeren ist mit den Angaben der Clampschen Arbeit identisch. Die Bezeichnung der einzelnen Kohlenhydratisomeren erfolgt daher, soweit bekannt, analog. Eine bessere Trennung von Mannose und Galaktose gelingt auch nicht

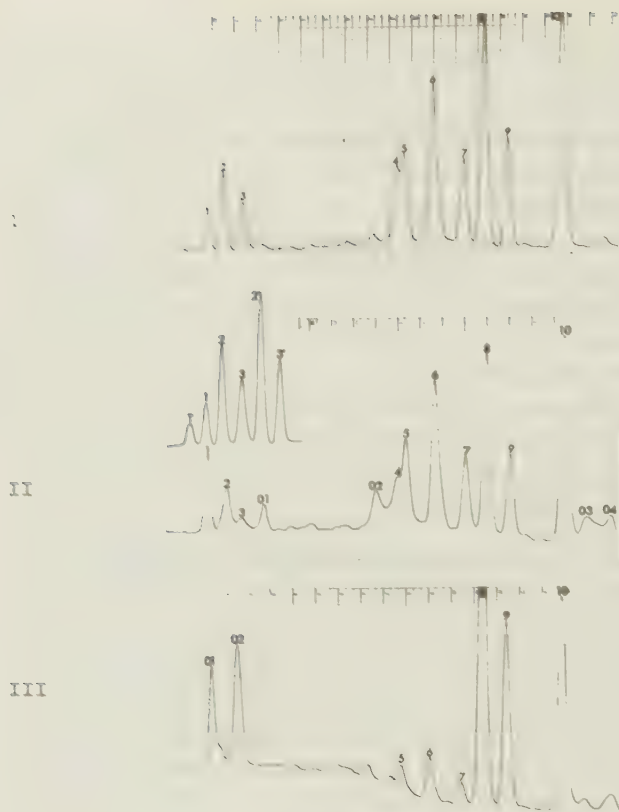


Abb. 3: Gaschromatographische Trennung der für Kollagen charakteristischen Monosaccharide als TMS-Glycoside (Experimentelle Bedingungen siehe Versuch 5)

I. Testgemisch

1,2,3:Fuc (f, α -p, β -p); 4:Man (β -p);
5,6,7:Gal (f, α -p, β -p); 8,9:Glc (Anom. Formen unbek.);
10:Mannit als interner Standard

II. Actinocol

1,2,3:Fuc; 4:Man; 5,6,7:Gal; 8,9:Glc;
10:Mannit; 01,02: unbekannte Peaks; 1',2',3':
Xylose

III. Fasciocol

5,6,7:Gal; 8,9:Glc; 10:Mannit
01,02: unbekannte Peaks.

durch die Variation der Geräteparameter.

Die Identifizierung der Kohlenhydrat-Komponenten der Kollagene geschieht durch Co-chromatographie mit TMS-Glycosiden der einzelnen Monosaccharide, die unter identischen Versuchsbedingungen hergestellt wurden.

Wie Abb. 3, II, zeigt, sind in Actinocol Fucose, Mannose, Galaktose und Glucose vorhanden. Die quantitative Verteilung der Fucose-Isomeren ist, verglichen mit dem Testgemisch, anders. Der Peak O1 konnte nicht zugeordnet werden; er ist zwar mit dem großen Isomerenpeak der Xylose identisch, aber die beiden anderen Isomeren können nicht nachgewiesen werden (siehe das Vergleichschromatogramm in Abb. 3,II). Für Peak O2 ist der Verdacht auf Uronsäuren auszuschließen, denn die entsprechenden Peaks chromatographieren anders. Clamp et al. verneinen auf Grund ihrer Versuche das Auftreten von Aminosäuren. Dagegen identifizieren Pikkarainen et al. (1972) bei der Kohlenhydrat-Untersuchung verschiedener Kollagene unbekannte Peaks mittels der Massenspektrometrie als Prolylhydroxyprolin, Leucylhydroxyprolin und Serylhydroxyprolin. Trotz der hier verwendeten anderen Versuchsbedingungen (Hydrolyse im wässrigen Milieu, anderes Silylierungsgemisch und andere Säulenfüllungen) könnten O2 und eventuell auch O1 solche Hydrolyseartefakte des Proteinanteils sein.

Für Fasciocol ist Glucose eindeutig, wie Abb.3, III, zeigt, kann bei etwa zweifacher Verstärkung (verglichen mit dem Actinocol-chromatogramm) auch Galaktose noch gut erkannt werden. O1 und O2 chromatographierten mit keiner Pentose, es gilt daher wie für Actinocol der Verdacht auf unspezifische Nebenprodukte. Weitere Kohlenhydrat-Komponenten sind ausgeschlossen, da eine angereicherte Fraktion enzymatisch verdauten Fasciocols ebenfalls nur Glucose und Galaktose enthält (siehe Teil II).

Zur quantitativen Bestimmung (Erstellen der Eichkurven, Aus-

wertung und Berechnung siehe Versuch 5) dient D-Mannit als interner Standard, ein von den Monosaccharidisomeren gut getrennter einzelner Peak. Da Kollagen zusammen mit bekannten Mengen D-Mannit hydrolysiert wird, brauchen Korrekturen für Hydrolyse- und sonstige Verluste der Kollagen-Kohlenhydrate nicht angebracht zu werden.

Die Peakflächen der Isomeren lassen sich durch Multiplikation der Grundlinie in halber Höhe ($g/2$) mit der Gesamthöhe (h) ermitteln, für Mannose dient nur die linke Hälfte von $g/2$ als Berechnungsgrundlage, um den Einfluß des Galaktoseisomeren zu mindern. Für die einzelnen Monosaccharide werden die Summe der Flächen folgender Isomere verwendet:

Fucose alle drei, Galaktose die zwei gut getrennten und von der Glucose beide Isomere. Die quantitativen Ergebnisse sind in Tab. 5 zusammengefaßt und werden anschließend diskutiert (siehe I,5).

Die Erfassungsgrenze dieser Methode liegt wegen der elektronischen Verstärkung bei etwa 0,02 - 0,05 μMol Monosaccharide pro mg Kollagen, oder anders ausgedrückt, bei 0,4 Gew.%. Mehr als 3 mg Einwaage Protein pro Hydrolyse ergeben, wenn man den Schreiber auf höchstmögliche Empfindlichkeit stellt, eine unruhige Grundlinie. Versuche, die mit der Anthronmethode gemessenen

Tab. 5: Quantitative Verteilung der Monosaccharide in Actinocol-PLK und Fasciocol-PLK (Bestimmungsmethode: Gaschromatographie)

	----- Gewichtsprozent -----			
	Glc	Gal	Man	Fuc
Fasciocol-PLK	7,60	1,03	-	-
Actinocol-PLK	3,75	3,42	1,49	0,60
Actinocol (α -Frakt.)	2,75	2,93	1,30	1,30

0,2% Hexose in den α 1- bzw. α 2-Ketten von Kalbshautkollagen näher zu charakterisieren, schlugen daher fehl.

Hexosamine erscheinen nach dem Mannit-Kleine diesbezügliche Peaks in den Chromatogrammen von Actinocol und Fasciocol konnten nicht eindeutig als Hexosamine identifiziert werden, da sie unterhalb der Erfassungsgrenze lagen. Die Hexosamine liefern aber, wie Vergleichsteste zeigten, keine vollständig reproduzierbaren Ergebnisse.

5. Diskussion

Die in der vorliegenden Arbeit erstmals auf Kollagen angewendete gaschromatographische Kohlenhydratanalyse nach Clamp et al. (1967, 1970) erwies sich gegenüber anderen Methoden als hoch überlegen, und zwar in qualitativer wie auch in quantitativer Hinsicht.

So konnte Mannose bei der papierchromatographischen Untersuchung der Kohlenhydrate des Actinocols nicht gefunden werden. Fucose wurde mit dieser Methode zwar erfaßt; allerdings würde in Gegenwart anderer Pentosen eine Identifizierung auf erhebliche Schwierigkeiten stoßen. Auch die quantitativen Aussagen der gaschromatographischen Methoden sind zuverlässiger. Das rührt daher, daß bei den kolorimetrischen Verfahren eigentlich das Verhältnis der zu messenden Kohlenhydrate ebenso bekannt sein müßte wie die molaren Extinktionskoeffizienten der einzelnen Komponenten. Da das naturgemäß aber bei einer unbekannten Substanz nicht der Fall ist, erhält man mit der Orcin- oder Anthronmethode stets nur Näherungswerte, in unserem Falle stets zu hohe Werte (vergl. Tab. 4 und 5). Ein prinzipieller Nachteil der kolorimetrischen Verfahren ist auch, daß sie keine Differenzierung zwischen den einzelnen Hexosen zulassen.

Der Hexosengehalt der α -Fraktion von Actinocol ist signifikant

niedriger als der des Actinocol-PLK, das durch mehrmaliges Umfällen gereinigt wurde; die Isolierung der α -Fraktion stellt also einen nicht zu unterschätzenden Reinigungseffekt für das Seeanemonenkollagen dar. Es ist zwar nicht völlig gesichert, ob bei der Gewinnung der α -Fraktion durch Gelchromatographie sämtliche Kohlenhydrat-Verunreinigungen abgetrennt werden können. Die Ergebnisse des Teiles II zeigen aber eindeutig, daß hohe Anteile Glucose und Galaktose fest an das Protein, d.h. an die Actinocol α -Ketten gebunden sind.

Dort wird auch der Frage nachgegangen, ob Mannose und Fucose echte Bestandteile des Actinocols sind. Diese beiden Kohlenhydrate konnten in den Fasciocol-Präparaten nicht nachgewiesen werden, obwohl dieses Kollagen nur durch Fällungsprozesse gereinigt werden kann. Der auffallende Befund, daß Fasciocol - im Gegensatz zu Actinocol - in weit überwiegender Menge Glucose enthält und nur wenig Galaktose (siehe Tab. 5), ist ebenfalls Gegenstand der Untersuchungen des folgenden Teils.

II. Charakterisierung des Typs der Kohlenhydrat-Protein-Bindung

1. Isolierung der Glycopeptidfraktionen I und II

Für die qualitative Untersuchung der Frage, wie die in Teil A, I beschriebenen Kohlenhydrate an die Peptidketten des Actinocols, Fasciocols und Helicols gebunden sind, waren von vornherein die Proteine selbst weniger geeignet: die hierfür in Frage kommenden Aminosäuren (Hyl, Ser, Thr) treten jeweils nur in prozentual geringen Mengen auf. Einer solchen Untersuchung mußten also Prozesse, die einer Anreicherung der zu untersuchenden Komponenten gleichkommen, vorangestellt werden. Die Glycoproteine wurden

daher mit Kollagenase und Pronase schonend verdaut. Da beide Proteasen keine Glycoside spalten, bleiben Glycopeptidbindung und Saccharidanteil intakt. Die im Handel erhältliche Rohkollagenase (aus *Cl.histoliticum*) enthält noch geringe Verunreinigungen unspezifischer Peptidasenaktivität, was aber dem eigentlichen Zweck - möglichst weitgehenden Abbau des Proteinanteils - nur dient. Nach 72 Stunden Kollagenaseabbau werden noch vorhandene größere Peptide mit Pronase (ein Gemisch proteolytischer Enzyme mit sehr breiter Spezifität aus *Strept. griseus*) 48 Stunden nachgespalten (Versuch 6).

Zur Fraktionierung der so gewonnenen Glycopeptide eignet sich, wie die Abb. 4, I-IV, zeigt, die Gelchromatographie mit Sephadex G-25 (Versuch 7a). Die Abbaugemische von Actinocol-PLK, Fasciocol-PLK und Helicol-Gelatine ergeben je 2 Glycopeptidfraktionen, die zusammen etwa 90% der aufgetragenen Hexosen repräsentieren. Peak I erscheint im Ausschlussvolumen des Gels, Peak II kommt innerhalb des Trennbereiches; es wird sogar eine teilweise Abtrennung von der Hauptmenge des ninhydrinpositiven Materials erreicht.

Alle folgenden Untersuchungen mit Actinocol, Fasciocol und Helicol, bzw. mit den entsprechenden Glycopeptidfraktionen wurden in gleicher Weise durchgeführt. Es ist daher in den folgenden Abschnitten zur Textvereinfachung nur von Invertebratenkollagen oder Glycopeptidfraktion I und II die Rede.

Spiro (1967a, 1969) erhielt analoge Fraktionierungsergebnisse mit den von ihm untersuchten Kollagen-Abbaupeptiden (Kollagene aus Karpfenschwimmbblasen, Augenlinsen und Nierenglomeruli). Eigene Versuche mit Ichthyocol *) bestätigen diese Befunde

*) Das durch Pepsinabbau gewonnene Kollagen der Karpfenschwimmblaste wurde von Dr. Meigel freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

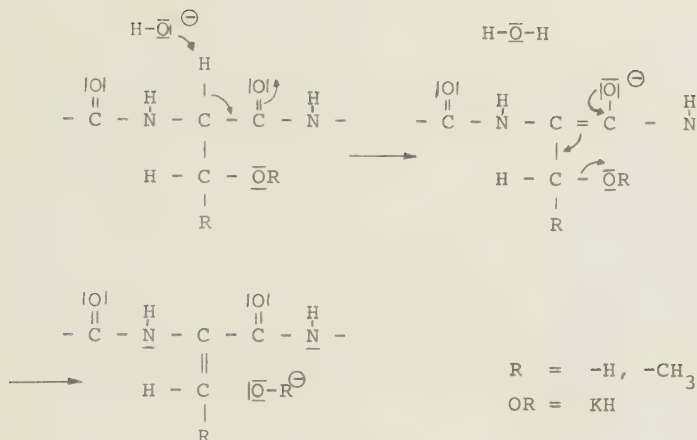
(Abb. 4 IV). Spiro untersuchte die Glycopeptidfraktion I des Ichthyocols wegen der geringen Ausbeuten nicht; in der Fraktion II fand er Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl. Die Glycopeptidfraktionen II der beiden anderen Kollagene enthielten nur das Disaccharid, während in den entsprechenden Fraktionen I von Spiro (1967a) in großer Menge ein sogenanntes Heteropolysaccharid gefunden wurde, auf das weiter unten noch näher eingegangen wird.

Außer mit diesen Kohlenhydrat-Komponenten mußte in den Glycopeptidpeaks I und II der Invertebratenkollagene auch mit den schon in der Einleitung erwähnten Serin- bzw. Threonin-gebundenen Kohlenhydraten gerechnet werden, die Lee und Muir (1970) bei einem vergleichbaren Vorgehen als Bestandteile des Kollagens der Regenwurm-Cuticula gefunden hatten.

2. Sind die Kohlenhydrate der Invertebratenkollagene an Serin bzw. Threonin gebunden ?

Glycoproteine der verschiedensten Herkunft enthalten Kohlenhydrate, die an die OH-Gruppen der Seitenketten von Serin oder Threonin gebunden sind; eine gute Übersicht hierüber gibt Spiro (1970). Man unterscheidet verschiedene Typen, je nachdem, welches Monosaccharid die Bindung an eine der beiden Aminosäuren herstellt.

Die Glycosidbindungen der α -Amino- β -Hydroxycarbonsäuren unterliegen bei Einwirkung von nucleophilen Agentien schon bei milden Bedingungen der β -Eliminierung (Gottschalk und Mitarbeiter, 1965). In Gegenwart schwacher Alkalien läuft die Reaktion nach folgendem Schema ab, aber nur, wenn Amino- und Carboxylgruppe peptidgebunden sind:

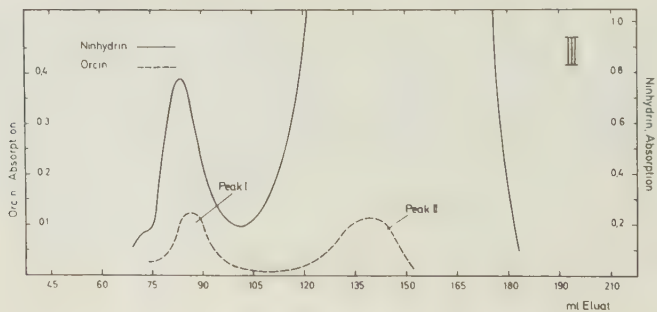
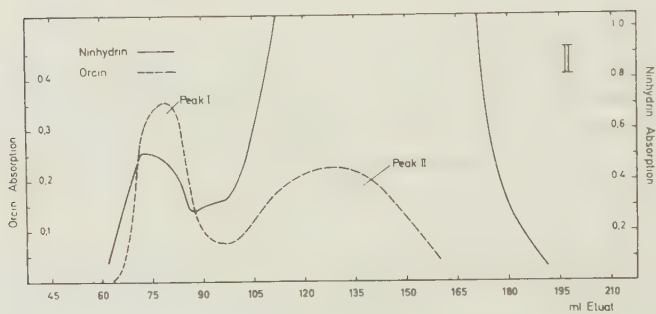
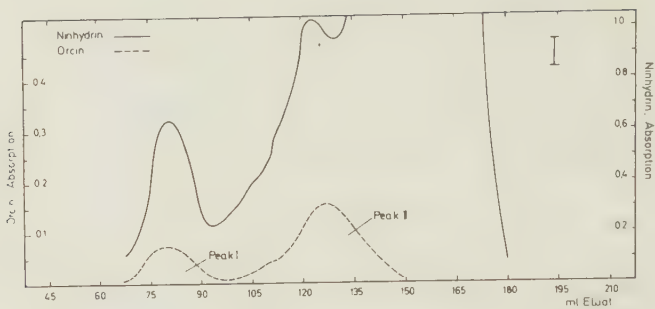


Aus Serin bzw. Threonin entstehen auf diese Weise α -Aminoacrylsäure bzw. α -Aminocrotonsäure, die mit Natriumborhydrid in Gegenwart von Palladium-II-chlorid (Lee und Lang, 1968) zu Alanin bzw. α -Aminobuttersäure hydriert werden können. Es bestehen zum Nachweis dieser Bindungen also zwei Möglichkeiten:

- a) Die reduzierten Aminosäuren werden nach saurer Hydrolyse am Aminosäureanalysator nachgewiesen. Der Serin- oder Threonin-Abnahme muß dabei eine stöchiometrische Zunahme an Alanin oder α -Aminobuttersäure entsprechen.

Die Glycosidfraktionen I und II der Invertebratenkollagene wurden nach der von Lee und Lang (1968) ausgearbeiteten Methode zur Identifizierung der alkalilabilen Bindungen getestet (die Reaktionsbedingungen sind im Versuch 8 angegeben); innerhalb der Genauigkeit einer quantitativen Aminosäure-Analyse konnte weder eine Abnahme der Hydroxyaminosäuren noch das Auftreten der Hydrierungsprodukte nachgewiesen werden.

- b) Nachweis und Untersuchung der abgespaltenen Kohlenhydrate



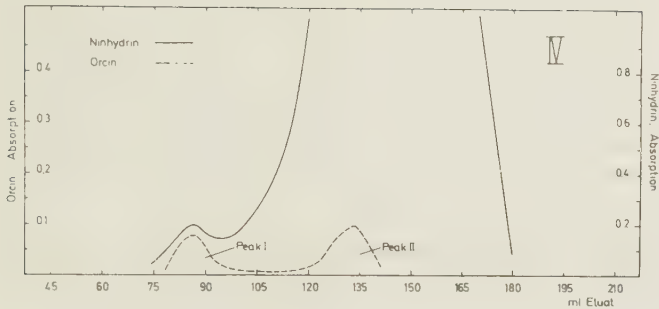


Abb. 4: Fraktionierung der Peptidgemische von Invertebratenkollagenen an Sephadex G-25. Die Kollagene wurden mit Kollagenase und Pronase verdaut.

Aufgetragen wurden bei I-III je 50 mg enzymatisch abgebautes Kollagen, bei IV 75 mg.

Elutionsmittel: 0,1 m Pyridinacetat, pH 5,6.

Weitere exp. Bedingungen siehe Versuch 7

- I Actinocol-PLK
- II Fasciocol-PLK
- III Helicol-Gelatine
- IV Ichthyocol-PLK

sind relativ einfach mit der Papier- bzw. Dünnschichtchromatographie, mit Farbtesten oder gaschromatographisch möglich. Die Fraktionen I und II wurden daher, wie im Versuch 8 angegeben, behandelt (allerdings ohne PdCl_2) und nach Entfernung der Borsäure an einer kombinierten Kationen- und Anionenaustauschersäule (siehe Versuch 2a) entsalzt. Die papierchromatographische Prüfung auf reduzierende Mono- und Oligosaccharide (nach Versuch 3a) war negativ.

Um sicherzustellen, daß während des enzymatischen Abbaus oder bei der Gelchromatographie nicht strukturelle Veränderungen eintraten, wurden die Kollagene selbst mit 1 M Hydroxylamin als Nucleophil bei pH 11,9 behandelt und nach dem Gefriertrocknen an P2 chromatographiert (Versuch 9).

Das zwischen Kollagen und Salzpeak liegende Eluat gab nach dem Einengen weder papier- noch dünnschichtchromatographisch oder im Anthrontest einen Hinweis auf reduzierende Kohlenhydrate.

3. Sind die Kohlenhydrate der Invertebratenkollagene an Hydroxylysin gebunden ?

a) Vorversuche mit der alkalisch hydrolysierten Glycopeptidfraktion II

Die Glycopeptide der Wirbeltierkollagene, Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl, waren nach alkalischer Proteinhydrolyse mit den Techniken der Aminosäureidentifizierung, wie Papierchromatographie, Hochspannungselektrophorese oder am Aminosäureanalysator nachgewiesen worden (Spiro, 1969; Moczar und Moczar, 1970). Glycosidbindungen bleiben unter diesen Bedingungen intakt. Actinocol, Fasciocol und Helicol besitzen im Vergleich zu Vertebratenkollagenen einen extrem hohen Hydroxylysin-Gehalt.

Es war also zu untersuchen, ob die genannten Komponenten auch hier existieren.

Erste Hinweise auf das Vorhandensein Hydroxylysin-gebundener Kohlenhydrate ergaben Papierchromatographie und Hochspannungselektrophorese der an Dowex 50W-X4 entsalzten, alkalisch hydrolysierten Fraktionen I und II (Versuche 10a und 10b). Das Laufmittel der Papierchromatographie (in absteigender Anordnung) ist so gewählt, daß saure und neutrale Aminosäuren während der Laufzeit von 72 Stunden entfernt werden, dagegen bleibt die Mobilität der basischen Aminosäuren klein. Hydroxylysin, Lysin, Histidin und Ornithin (dieses entsteht bei der alkalischen Hydrolyse aus Arginin) trennen sich trotzdem gut auf; die Aufzählung gibt zugleich die Zunahme der Rf-Werte an. Nach der Hochspannungselektrophorese finden sich diese basischen Aminosäuren in Richtung zur Anode in gleicher Reihenfolge wie im Papierchromatogramm. Mit Hilfe dieser zwei analytischen Methoden wurde nur bei der Fraktion II ein ninhydrinpositiver Fleck gefunden. Sein Rf-Wert war kleiner als der von Hydroxylysin und charakterisiert nach Spiro (1967b) das Auftreten Hydroxylysin-gebundener Kohlenhydrate. Dies konnte später durch entsprechende Referenzsubstanzen bestätigt werden (siehe unten).

Es wurde nun eine präparative Anreicherung der Hydroxylysin-Glycoside aus der alkalisch hydrolysierten Fraktion II versucht. Gal-Hyl bzw. Glc-Gal-Hyl (Molgewicht 324 bzw 586) trennen sich an Sephadex G-15 (Trennbereich < 1500) von freien Aminosäuren und Salz. Die Abb. 5 zeigt deutlich die Separierung einer Glycopeptidfraktion von jeweils gleichem Elutionsvolumen vom übrigen ninhydrinpositivem Material. Diese Fraktion wird im folgenden stets als IIa bezeichnet.

Zur weiteren Identifizierung von Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl eignet sich die Aminosäureanalyse alkalischer Hydrolysate unter bestimmten Bedingungen (Spiro, 1969; s. Abschnitt A II, 4b).

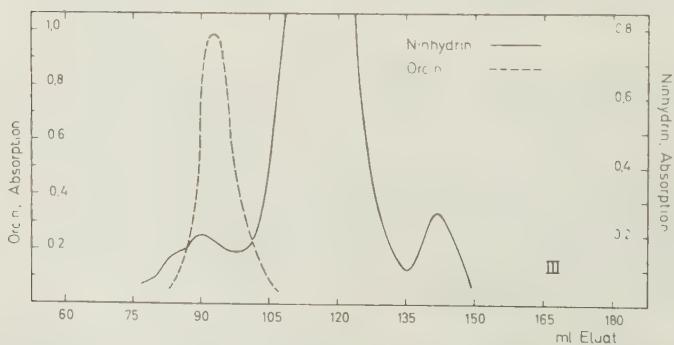
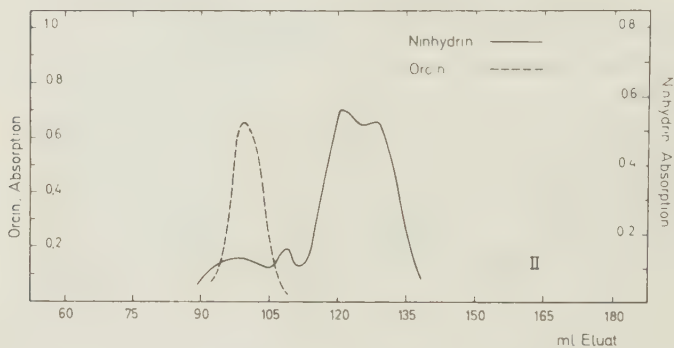
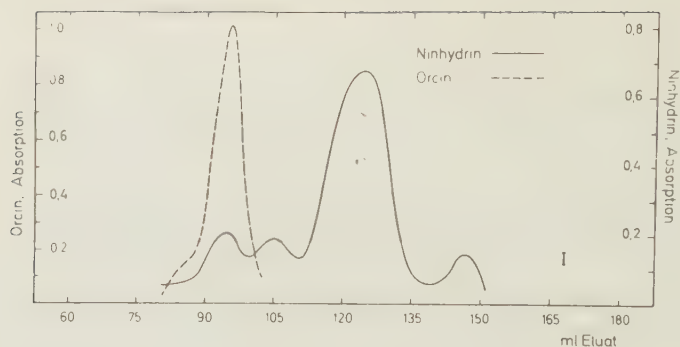


Abb. 5: Fraktionierung der Glycopeptidfraktionen II nach alkalischer Hydrolyse an Sephadex G-15. Aufgetragen wurde ein Aliquot das etwa 3-6 μ Mol Kohlenhydrate enthielt. Elutionsmittel: 0,1 m Pyridinacetat, pH 5,6 Weitere exp. Bedingungen siehe Versuch 13
 I Actinocol
 II Fasciocol
 III Helicol-Gelatine

Die Glycopeptidfraktion IIa wurde am Aminosäureanalysator getestet und zeigte neben unbedeutenden Spuren von Hydroxylysin zwei unbekannte Peaks, deren Flächenverhältnis etwa 9:1 betrug. (Versuch 14).

Co-Chromatographieversuche mit authentischem Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl ^{*)} ergaben, daß Glc-Gal-Hyl mit dem größeren der beiden erwähnten Peaks, Gal-Hyl mit dem kleineren Peak eluiert wird.

b) Partielle Säurehydrolyse der Glycopeptidfraktion IIa

Für sequenzanalytische Untersuchungen von Peptidketten ist die Edmanmethode inzwischen so weit verfeinert worden, daß automatische Peptidsequenzer bis zu 50 Abbauschritte erreichen. Chemische Methoden, die Reihenfolge verschiedener Monosaccharide eines Oligosaccharids auf ähnliche Weise zu ermitteln, sind unbekannt. Enzymatische Spaltungen mit Exoglycosidasen (in ihrer Wirkung etwa den Carboxypeptidasen oder Amino-peptidasen vergleichbar) bereiten in der Handhabung große Schwierigkeiten.

Da bei Hydroxylysin-Glycopeptiden aber der Angriff an der Kohlenhydrat-Aminosäure-Verknüpfung durch schwache Säuren wegen der Protonisierung der freien NH_2 -Gruppe erschwert ist, kann man eine successive Spaltung solcher Glycoside vom Kohlenhydratende her erwarten.

Um die Identität der Kohlenhydrat-Sequenz des großen Peaks zu sichern, wurden also Aliquote der Glycopeptidfraktionen IIa verschieden lange, nämlich 4,8,12,16 und 24 Stunden mit 0,1 n HCl bei 100°C hydrolysiert; die abgespaltenen Kohlenhydrate (Glc,Gal) wurden quantitativ erfaßt. Gut geeignet hierfür er-

^{*)} Die Referenzsubstanzen stellten freundlicherweise Dr.R.G. Spiro, Boston/USA, und Dr.L.W. Cunningham, Nashville/USA, zur Verfügung.

wies sich die enzymatische Bestimmung der freigesetzten Saccharide mit den NAD- bzw. NADP-abhängigen Enzymen β -Galaktose-Dehydrogenase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (genaue Angaben siehe Versuch 11).

Störungen durch das Dextran des Sephadex G-15, das zur Gewinnung der untersuchten Fraktion IIa benutzt worden war, konnten ausgeschlossen werden; in 100 ml Kontroll-Eluat konnten bei einer gaschromatographischen Untersuchung nach methanolischer Salzsäurehydrolyse keine Kohlenhydrate nachgewiesen werden.

Der Quotient Mol Kohlenhydrat/Mol Glycopeptid wurde gegen die Hydrolysezeit aufgetragen (Abb.6). Für die aus Actinocol und Fasciocol gewonnenen Peptide wurde gefunden, daß aus der Fraktion IIa Glucose rascher abgespalten wird als Galaktose.

Untersucht man die Partialhydrolysate am Aminosäureanalysator (s. Abschnitt A II, 4b), so findet man, daß nach 24 Stunden Hydrolyse der als Gal-Hyl identifizierte "kleine Peak" auf Kosten des "großen Peaks" (Glc-Gal-Hyl) größer geworden ist.

Bei den Hydroxylysin-Glycopeptiden der Invertebratenkollagene muß folglich, ebenso wie bei den Vertebratenkollagenen, die Struktur Glc-Gal-Hyl bzw. Gal-Hyl vorliegen.

4. Quantitative Bestimmung der an Hydroxylysin gebundenen Kohlenhydrate

Die im vorigen Abschnitt geschilderten Ergebnisse ließen zwei Fragen offen: 1) Wie groß ist der Anteil des Hydroxylysin der einzelnen Kollagene, der im Verlauf der Biosynthese mit Hexose beladen wird ? 2) Wie ist das quantitative Verhältnis zwischen Mono- und Disaccharid bei den einzelnen Kollagenen ?

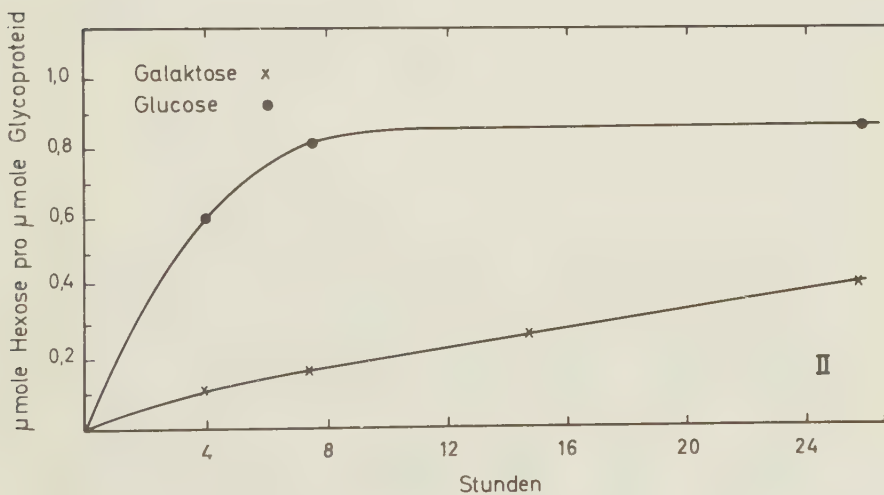
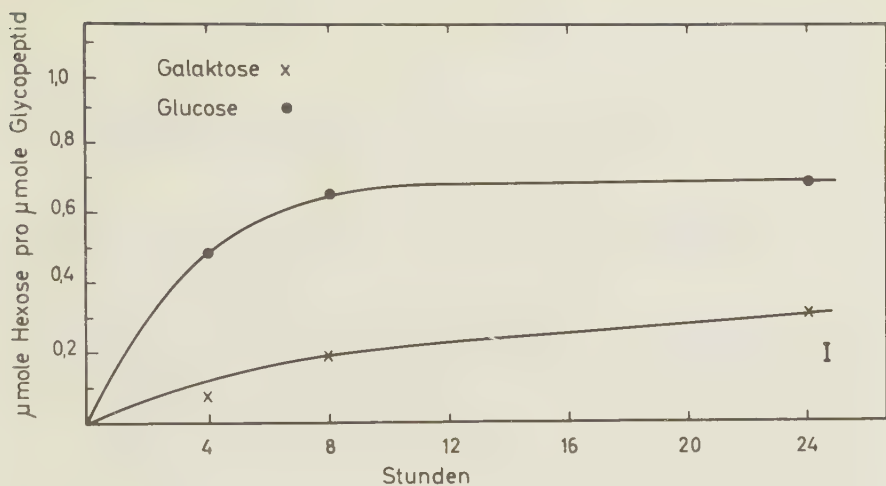
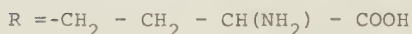
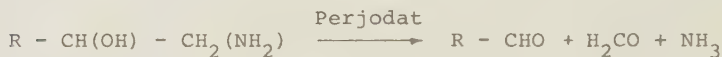


Abb. 6: Partielle Säurehydrolyse der
Glycopeptidfraktionen IIa
Experimentelle Angaben siehe Versuch 11
I Actinocol
II Fasciocol

Auf die Relevanz solcher Fragen für Strukturprobleme des Kollagens wird in der Diskussion des Teils A II näher eingegangen.

a) Perjodatoxydation der nicht glycosylierten Hydroxylysinreste

Hydroxylysin reagiert als α, ϵ -Diamino- δ -Hydroxylcapronsäure, wie van Slyke und Mitarbeiter (1940) bei der Strukturaufklärung zeigten, rasch mit Perjodat im alkalischen Milieu; die Aminoalkoholgruppe bildet dabei quantitativ je 1 Mol Formaldehyd und Ammoniak. In saurer Lösung ist die Reaktion langsam und wenig spezifisch.



Ebenso reagieren Serin und Threonin, aber nur die freien, nicht peptidgebundenen Aminosäuren.

Im Gegensatz dazu spaltet alkalisches Perjodat sowohl freies als auch peptidgebundenes Hydroxylysin, allerdings nicht glycosyliertes Hydroxylysin. Dieser Umstand eröffnet eine Möglichkeit zur Differenzierung zwischen Hydroxylysinresten, die mit Kohlenhydraten besetzt sind und solchen, deren OH-Gruppen frei sind.

Die Wahl der richtigen Reaktionsparameter ist allerdings schwierig. Hörmann und Fries (1958) behandelten Hautkollagen mit 0,02 m Perjodat in 8% Essigsäure. Nach 5 Stunden fanden sich noch 50% Hydroxylysin wieder, was aber nicht dem Kohlenhydratgebundenen Anteil entspricht; 100% Zerstörung des freien Hydroxylysin war erst nach 6 Tagen erreicht.

Franzblau und Aronson (1967) fanden dagegen, daß 0,06 m Perjodat im alkalischen Milieu nicht glycosyliertes Hydroxylysin in Kollagen schon nach 2 Minuten bei Zimmertemperatur zerstört. Auch nach 2-stündiger Einwirkung treten nach den Angaben der Autoren keine unspezifischen Spaltungen auf.

Die Invertebratenkollagene wurden daher mit einer alkalischen Perjodatlösung behandelt; nach 2 Stunden wurde das Perjodat am Anionenaustauscher entfernt und eine quantitative Aminosäureanalyse durchgeführt.

Das in Tabelle 6 zusammengestellte Ergebnis zeigt deutlich, daß bei den drei untersuchten Invertebratenkollagenen etwa drei Viertel aller Hydroxylysinreste glycosyliert sind. Die angegebenen Zahlen sind Mittelwerte aus mehreren Bestimmungen, die gefundenen Abweichungen betragen etwa $\pm 7\%$. Unter Berücksichtigung dieser methodischen Fehlerbreite repräsentiert aber die Summe von Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl für alle drei Kollagene annähernd den gleichen Prozentsatz.

Tab. 6: Hydroxylysin-gebundene Kohlenhydrate der drei Invertebratenkollagene, bestimmt nach der Perjodatomethode

	Hyl gesamt ^a		Hyl gebunden ^b		Hyl frei ^c	
	Mole/α-Kette %		Mole/α-Kette %		Mole/α-Kette %	
Actinocol-PLK	29	100	23,0	79,4	6,0	20,7
Fasciocol-PLK	22	100	17,3	78,8	4,7	21,4
Helicol-Gel.	11	100	8,7	79,0	2,3	20,9

a) nach saurer Hydrolyse am Aminosäure-Analysator bestimmt

b) nach Perjodatoxydation und saurer Hydrolyse am Aminosäure-Analysator bestimmt

c) als Differenz von a und b berechnet.

b) Bestimmung von Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl mit dem Aminosäure-analysator

Eine elegante Methode, die Hydroxylysin-gebundenen Kohlenhydrate und zugleich die auf Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl entfallenden Anteile zu bestimmen, bietet die Aminosäureanalyse der alkalisch hydrolysierten Kollagene.

Spiro (1969), der diese Methode entwickelte, hatte aber nur teilweise Erfolg. An dem von ihm benutzten Technicon-Aminosäureanalysator (mit linearem Puffergradienten) chromatographieren Glc-Gal-Hyl zwischen Val und Met, Gal-Hyl aber zusammen mit Tyr oder Phe. Um nun trotzdem Gal-Hyl in alkalisch hydrolysierten Vertebratenkollagenen bestimmen zu können, trennte Spiro (1969) die Hydroxylysin-gebundenen Kohlenhydrate mittels der präparativen Papierchromatographie von den Aminosäuren ab und bestimmte erst anschließend am Aminosäureanalysator Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl.

Unser Gerät BC 200 der Firma Bio-Cal arbeitet mit einem Stufengradienten von 4 Puffern und ist mit einem anderen Harz ausgerüstet; besonders der zuletzt genannte Parameter hat großen Einfluß auf die Trennung. Unter den normalen, für eine Aminosäureanalyse ausreichenden Bedingungen, erscheint Glc-Gal-Hyl gut getrennt von Ile und Tyr, Gal-Hyl aber zusammen mit Phe.

Da die oben erwähnte papierchromatographische Hilfsmethode mindestens 3 Tage dauert und andererseits der experimentelle Fehler bei Überwiegen eines der beiden Hydroxylysin-gebundenen Kohlenhydrate groß ist, mußte für den BC 200-Analysator ein spezielles Programm zur Trennung von Phe und Gal-Hyl ausgearbeitet werden. Das sollte durch die richtige Wahl von Größen wie Harz, H^+ -Ionenkonzentration der Puffer und Laufzeit der einzelnen Puffer möglich sein. Die schließlich gefundene experimentelle Lösung der geschilderten Probleme ist im

experimentellen Teil als Versuch 14 zusammengefaßt.

Vor allem erwies sich nach langwierigen Vorversuchen die Verwendung von Aminex A-6, einem sphärischen Kationenaustauscher-Harz, sowie die verlängerte Laufzeit des sog. "C-Puffers" (Versuch 14) als günstig. Phe wird unter diesen Bedingungen, im Gegensatz zu Gal-Hyl, noch eluiert. Wird nun der D-Puffer zugeschaltet, so erscheint gut abgetrennt Gal-Hyl (siehe Abb. 7 a-c). Beim normalen Aminosäureanalyse-Programm fällt der Wechsel der C- bzw. D-Puffer mit dem Erscheinen des Tyr- oder Phe-Peaks zusammen. Die im Versuch 14 angegebenen Laufzeiten der 4 Puffer sind Mittelwerte, die je nach Alter und Packungsdichte des Harzes variieren können.

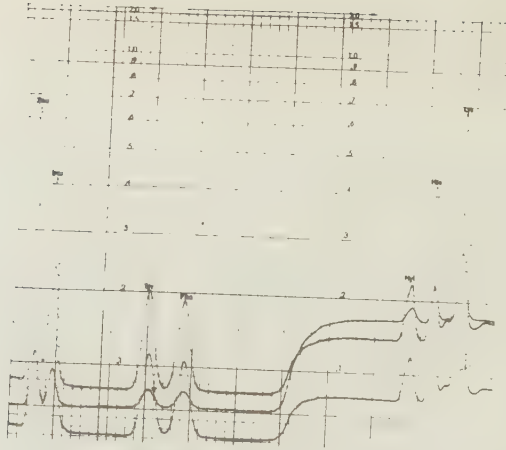
Zur quantitativen Bestimmung der Hydroxylysin-gebundenen Kohlenhydrate genügen etwa 0,8 mg Kollagen, die nach Versuch 13 alkalisch hydrolysiert werden.

Durch das bei der Hydrolyse verwendete Alkali werden etwa 15% freies Hydroxylysin und Kohlenhydrat-gebundenes Hydroxylysin zu etwa gleichen Teilen zerstört. Die im Versuch 14 angeführte Berechnungsweise muß diesen Umstand jedoch nicht berücksichtigen, da sie auf einer vorausgegangenen Bestimmung der insgesamt vorhandenen Mole Hydroxylysin (nach saurer Hydrolyse) beruht. Die erhaltenen Prozentwerte lassen sich also wieder in Absolutwerte umrechnen, ohne Korrekturen anbringen zu müssen.

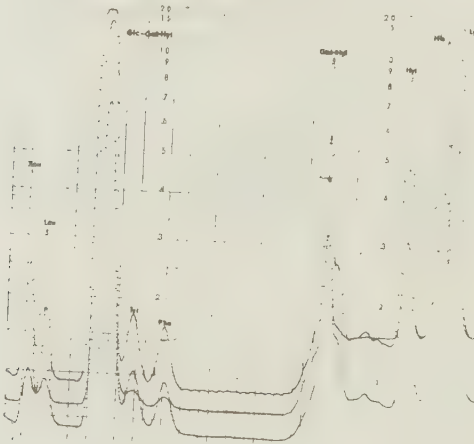
Tab. 7: Verteilung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und freiem Hyl in Actinocol, Fasciocol und Helicol

	Gal-Hyl		Glc-Gal-Hyl		freies Hyl	
	Mole/ α -Kette %		Mole/ α -Kette %		Mole/ α -Kette %	
Actinocol-PLK	1,5	5,2	20,5	70,4	7,0	24,2
Fasciocol-PLK	1,2	5,5	17,1	77,7	3,7	16,8
Helicol-Gel.	0,4	3,6	7,0	63,6	3,6	32,7

a)



b)



c)

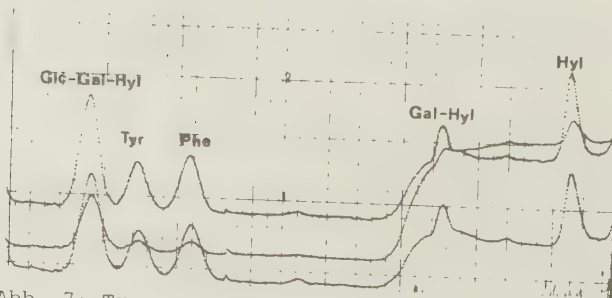


Abb. 7: Trennung von Glc-Gal-Hyl, Phe, Tyr und Gal-Hyl am Aminosäureanalysator

a) Test ohne Hyl-Glycoside

b) Test mit Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl

c) Helicol-Gelatine, alkalisch hydrolysiert

Die neu ausgearbeitete Methode ermöglicht eine sehr genaue Bestimmung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und nicht glycosyliertem Hydroxylysin im Kollagen. Wie die Tab. 7 erkennen läßt, wird so die Aussagekraft der mit der Perjodatmethode sowie durch Aminosäureanalyse der Glycopeptidfraktionen IIa erhaltenen Ergebnisse eindrucksvoll bestätigt: ein sehr hoher Prozentsatz der Hydroxylysinreste in Invertebratenkollagenen ist glycosyliert, und zwar in Form des Disaccharids. Monosaccharid ist nur sehr wenig, nämlich etwa 1 Mol pro α -Kette, vorhanden; da nach Spiro (1967b) Gal-Hyl immer zu ca. 5% als Artefakt der alkalischen Hydrolyse entsteht, ist sogar zweifelhaft, ob in den untersuchten Kollagenen Gal-Hyl überhaupt vorliegt.

In der anschließenden Diskussion wird versucht, auf Grund der vorliegenden Kohlenhydrat-Analysen die Stellung von Actinocol, Fasciocol und Helicol innerhalb der Kollagenfamilie näher zu charakterisieren.

5. Untersuchung der Glycopeptidfraktion I

Zur weiteren Charakterisierung der Kohlenhydrat-Proteinbindungstypen in Kollagen chromatographierte Spiro (1967) die Glycopeptidfraktion I von Membrankollagen an Sephadex G-50 und erhielt zwei Glycopeptid-Subfraktionen. Die entsprechenden Actinocol- und Fasciocol-Fraktionen ergaben bei analogem Vorgehen (Versuch 7a) nur je einen Peak ("Glycopeptidfraktion Ia", siehe Abb. 8).

Wie die in Tab. 8 und 9 zusammengestellten Ergebnisse weiter zeigen, sind die einzelnen Fraktionen der beiden Kollagenarten untereinander keineswegs identisch.

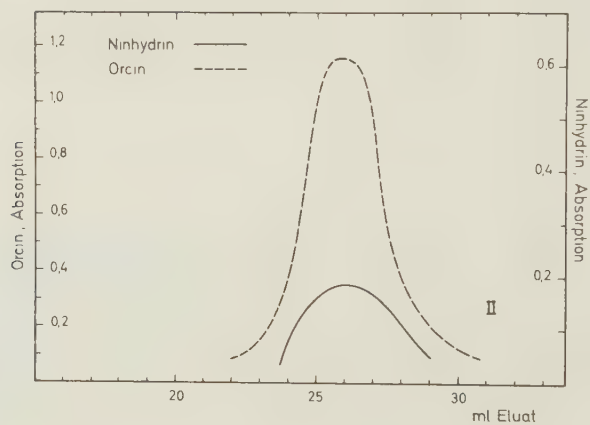
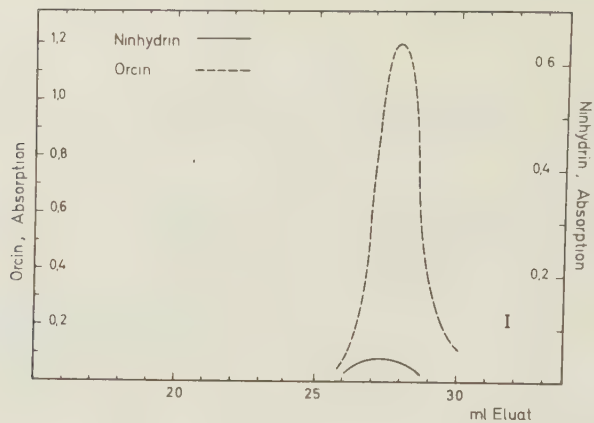


Abb. 8: Versuch zur Fraktionierung der Glycopeptidfraktion I an Sephadex G-50. Aufgetragen wurden bei I 10 mg und bei II 20 mg der Glycopeptidfraktion I. Elutionsmittel: 0,1 m Pyridinacetat. Weitere exp. Angaben siehe Versuch 7a.

I Actinocol
II Fasciocol

Tab. 8: Prozentuale Stickstoff- und Hexosenverteilung
in den Glycopeptidfraktionen I und Ia

	Actinocol		Fasciocol	
	N	Hex.	N	Hex.
Enzym. Hydrolysat	100	100	100	100
Glycopeptidfraktion I	1,3	10,7	19,7	40,6
Glycopeptidfraktion Ia	0,2	1,4	4,7	20,3

Tab.9: Kohlenhydrat-Zusammensetzung der Glycopeptidfraktionen Ia von Actinocol und Fasciocol (Bestimmungsmethode: Gaschromatographie)

	Hexose (Gew.-%)				
	Glc	Gal	Man	Fuc	Hexosamin
Actinocol	7,9	3,67	16,4	2,08	-
Fasciocol	26,4	Spuren	-	-	-

Weniger gut reproduzierbar waren die Aminosäureanalysen der beiden Glycopeptidfraktionen Ia, sie erwiesen sich als abhängig von der Charge der zum Abbau der Kollagene mitbenutzten Pronase. Der Gly- und Hyp-Gehalt ist jedoch in jedem Falle nicht unbedeutend, was Kollagenpeptide in dem Gemisch der Fraktion Ia vermuten läßt.

In der folgenden Diskussion wird eine Deutung dieser Ergebnisse im Zusammenhang mit anderen Resultaten der Arbeit versucht.

6. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen eindeutig, daß die großen Mengen Galaktose und Glucose, die in Invertebratenkollagenen nachgewiesen werden können, wie in den Kollagenen höherentwickelter Tiere an Hydroxylysin gebunden sind. Es konnte ferner gezeigt werden, daß Serin- bzw. Threonin-gebundene Kohlenhydrate ebensowenig vorkommen wie Hydroxyprolin-gebundene Glycoside. Der letztere Bindungstyp bedurfte keiner näheren Untersuchung, da die Glycopeptidfraktionen II die Iminosäure Hydroxyprolin nicht in signifikanter Menge enthielten. Die Existenz von Hydroxyprolin-Glycosiden scheint also auf Proteine pflanzlicher Zellwände beschränkt zu sein; man könnte sich vorstellen, daß solche Strukturen die Erfordernisse für die korrekte Ausbildung der komplizierten Tertiärstruktur (Kollagen-Tripelhelix) nicht erfüllen.

Man ist versucht, die quantitativen Aspekte der Hydroxylysin-Saccharide in Invertebratenkollagenen, sowohl ihre Gesamtmenge wie auch die relative Verteilung auf Mono- und Disaccharid, in einen Zusammenhang mit der biologischen Entwicklungsstufe der jeweiligen Tierspecies oder mit der Funktion der einzelnen Kollagenarten zu bringen. Die Tab. 10 zeigt am Beispiel des Kalbshautkollagens, daß die Kollagene höherentwickelter Tiere im allgemeinen nur wenig Hydroxylysin enthalten; ein hoher Prozentsatz hiervon ist frei, also nicht glycosyliert, Mono- und Disaccharid sind annähernd äquimolar verteilt. Im Gegensatz zu diesen Kollagenarten, deren Moleküle aus zwei α 1-Ketten und einer α 2-Kette aufgebaut sind, bestehen Knorpelkollagen (Typ II) und die Membrankollagene aus nur einem α -Kettentyp. Der Hydroxylysin-Gehalt ist signifikant größer, die Glycosylierungsrate liegt bei mindestens 65%, zum Teil sogar erheblich höher (Ausnahme: Knorpelkollagen); die kovalent gebundenen Hexosen finden

Tab. 10: Hydroxylysin-gebundene Kohlenhydrate in Kollagenen verschiedener Phyla

Kollagen aus	Literatur	Hyl gesamt Mole/ α-Kette %	Hyl frei Mole/ α-Kette %	Glc-Gal-Hyl Mole/ α-Kette %	Gal-Hyl Mole/ α-Kette %	Verhältnis Disaccharid: Monosaccharid
Kalbshaut	a	8,7 100	5,5 63,2	1,7 19,5	1,5 17,3	53 : 47
Knorpel (Huhn)	b	23,1 100	13,3 59,6	5,3 23,4	3,7 16,6	59 : 41
Nieren-Basal- membran (Rind)	a	22,3 100	5,2 23,3	16,4 73,5	0,5 2,2	97 : 3
Nierenglo- meruli (Human)	b	44,6 100	8,6 19,2	34 76,3	2 4,5	94 : 6
Augenkapsel (Schaf)	c	67,4 100	31,4 46,6	34 50,5	2 2,9	94 : 6
Descement- membran (Schaf)	c	43,0 100	15,2 35,7	26 60,1	1,8 4,2	93 : 7
Seeanemone	d	29 100	7,0 24,4	20,4 70,4	1,5 5,2	94 : 6
Leberegel	d	22 100	4,1 18,62	17 76,4	1 4,9	95 : 5
Schnecke	d	11 100	3,6 32,6	7,0 64,1	0,4 3,3	95 : 5

a) Spiro (1967a) b) Miller (1971) c) Kefalides (1971) d) diese Dissertation

sich nahezu quantitativ im Hydroxylysin-Disaccharid wieder (Ausnahme: Knorpelkollagen).

Die Invertebratenkollagene, wahrscheinlich ebenfalls aus nur einem α -Kettentyp bestehend, stehen in den hier diskutierten chemischen Eigenschaften dem Membrankollagen wesentlich näher als den Kollagenen der Bindegewebstypen, die Stützfunktionen erfüllen. Als einzige Ausnahme darf die absolute Menge an Hydroxylysin im Kollagen der Weinbergschnecke gelten.

Heißt das, daß ein hoher (absoluter wie relativer) Prozentsatz an Hydroxylysin-gebundenem Disaccharid charakteristisch für "biologisch ältere" Kollagene ist ? Diese Interpretation hat eine gewisse Wahrscheinlichkeit für sich, obwohl das vorliegende Untersuchungsmaterial für eine definitive Antwort nicht ausreicht. Schwerer zu entscheiden ist allerdings die sich daran anschließende Frage nach dem biologischen Sinn, nach der Funktion der Kohlenhydrat-Anteile im Kollagen. Möglicherweise spielen hier sterische Überlegungen herein: Stützgewebeskollagene werden in aller Regel wesentlich dichter gepackt sein als das Kollagen in Membranen, die durchlässig und deshalb von lockerer Struktur sein müssen. Die strukturelle Bedeutung der Kohlenhydrat-Komponente könnte also in einer Beeinflussung der Quartärstruktur und der Morphologie des Kollagens zu suchen sein. In der Diskussion zu Teil B wird experimentelle Evidenz dafür angeführt, daß ein negativer Einfluß der raumbeanspruchenden Hexosenanteile auf die Fibrillenbildung tatsächlich mehr als nur eine Hypothese ist.

Eine, möglicherweise im gegenwärtigen Stadium noch zu spekulative, in jedem Fall aber stark vereinfachende Deutung der bisher bekannten Ergebnisse über Kollagen als Glycoprotein läßt sich also etwa folgendermaßen formulieren: Invertebratenkollagene hatten und haben eine Art Mischfunktion zu erfüllen, im Zuge der Evolution ist eine Differenzierung in eine Membran-

und in eine Stützgewebsaufgabe erfolgt, was Konsequenzen beim tripelhelicalen Aufbau des Kollagenmoleküls und bei seinem Glycosylierungsgrad hatte. Wie sich Spezialfälle, etwa das Knorpelkollagen (Typ II), das Kollagen der Karpfenschwimmblase, die in der Einleitung erwähnten Anneliden Cuticula-Kollagene u.a. in ein solches generalisierendes Bild einfügen lassen, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten.

Bisher wurden ausschließlich die Hydroxyprolin-gebundenen Glycoside ausführlicher diskutiert und die Existenz von Serin-, Threonin- oder Hydroxyprolin-gebundenen Sacchariden in Invertebratenkollagenen verneint. Gilt letzteres auch für die sogenannten Heteropolysaccharidkomponenten ?

"Heteropolysaccharide" als Kollagenkomponenten wurden bisher von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen behauptet. Spiro (1967a) will ein aus Galaktose, Mannose, Fucose, Sialinsäure und Glucosamin bestehendes glucosefreies Heteropolysaccharid in Kollagenpräparationen aus Nierenglomeruli- und Augenlinsenmembranen gefunden haben. Kefalides (1971) gelang es jedoch, diese Kollagene mit höherem Reinheitsgrad zu isolieren; er konnte darin ausschließlich die beiden Hydroxylysin-Saccharide nachweisen, darüberhinaus aber keine weiteren Kohlenhydratkomponenten.

Das in dieser Arbeit untersuchte Actinocol in seiner bisher reinsten Form (α -Kettenpräparat) enthält sehr genau soviel Galaktose und Galaktosereste, wie man aus den Analysedaten für die Summe von Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl errechnet. Ein Galaktosehaltiges Heteropolysaccharid ist damit ausgeschlossen. Für Fasciocol gilt das gleiche, denn hier wird nur überzählige Galaktose (Tab. 5) gefunden.

Die Ergebnisse von Spiro (1967a) zur Frage eines Heteropolysaccharids sind also mit unseren Invertebratenmaterialien nicht reproduzierbar, was im Einklang mit Kefalides (1971) steht.

Ein anderes Heteropolysaccharid isolierten Katzman und Oronsky (1971) aus dem Kollagen der Seeanemone Metridium dianthus. Es hat die Sequenz GlcN-Man-Fuc und ist über das Glucosamin an Asparagin gebunden. Ist es aber ein echter Kollagenbestandteil oder entstammt es einer Glycoprotein-Verunreinigung? Fasciocol kann aus dem erwähnten Grund unberücksichtigt bleiben; Actinocol, ein Präparat aus einer anderen Seeanemonenart, enthält aber auch als α -Fraktion noch Mannose und Fucose, allerdings kein Hexosamin. Ein Heteropolysaccharidtyp, der dem von Katzman und Oronsky (1971) behaupteten ähnelt, kann für Actinocol also nicht völlig ausgeschlossen werden.

Allerdings sollte bedacht werden, daß die untersuchte Actinocol- α -Fraktion nur gelchromatographisch, nicht an Ionenaustauschern gereinigt wurde; kleine Verunreinigungen im Präparat sind deswegen durchaus vorstellbar. Für Fasciocol, das nur durch Umfällen gereinigt werden kann, muß man sogar größere Verunreinigungen diskutieren. Der große Überschuß an nicht Hydroxylysin-gebundener Glucose weist jedenfalls darauf hin.

Auf der anderen Seite muß aber der Vollständigkeit halber erwähnt werden, daß pepsinlösliche Präparate untersucht wurden. Es darf als sicher gelten, daß das Kollagenmolekül im Zuge der Pepsinbehandlung um einige Aminosäuren verkürzt wird. Bisher fehlt jeder Hinweis darauf, daß hier kollagenspezifische Saccharide gebunden sind. Sollte dies aber doch der Fall sein, wären sie mit den in dieser Arbeit verwendeten Materialien nicht nachweisbar.

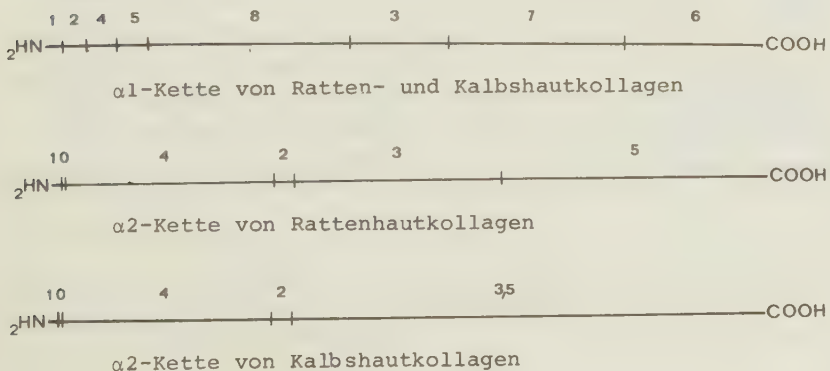
B) Hydroxylysin-gebundene Kohlenhydrate in Vertebratenkollagen

1. Bisher bekannte Ergebnisse

In den letzten Jahren wurden auf mehreren Gebieten der Kollagenforschung, wie der Biosynthese, der Immunologie und Primärstruktur des Kollagens, wichtige Fortschritte erzielt. Die Aufklärung der Aminosäuresequenz des Moleküls ist besonders durch die Größe der Peptidketten (jede besteht aus etwa 1040 Aminosäuren) erschwert und kann nur an definierten Spaltprodukten durchgeführt werden.

Um von der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette eine überschaubare Anzahl definierter Fragmente zu erhalten, hat sich die Spaltung am Methionin mit Bromcyan (Bornstein et al., 1966) als besonders günstig erwiesen, da im Kollagen nur etwa 5-7 Methioninreste pro Kette gefunden werden. Die CB Peptide der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette aus Kollagen von mehreren Species und Geweben sind bisher charakterisiert und ihre Reihenfolge entlang der Peptidkette festgestellt worden (Rauterberg u. Kühn 1970, Piez 1968) (siehe Abb. 9).

Abb. 9: Schematische Darstellung der CB-Peptide der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette von Ratten- und Kalbshautkollagen



Die neueste zusammenfassende Darstellung des gegenwärtigen Standes der Kollagenchemie erfolgt durch Traub und Piez (1971). Über den Gehalt und die Lokalisierung der an Hydroxylysin gebundenen Kohlenhydrate in den $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten ist bisher wenig bekannt. Cunningham und Butler (1966) gelang durch Anwendung einer kombinierten Kollagenase- Trypsinspaltung aus verschiedenen Vertebratenkollagenen die Isolierung des in Tab.11 angegebenen Hexapeptids II. Sie konnten dieses Peptid aber nicht der $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Kette zuordnen. Später wurden von Cunningham und Mitarbeitern (1970) mit der gleichen Methodik zwei weitere Glycopeptide isoliert (siehe Tab. 11, I und II). Die erste Zuordnung eines dieser drei Glycopeptide gelang Butler (1968). Bei der Untersuchung des Kohlenhydratgehalts der CB-Peptide der $\alpha 1$ -Kette aus Rattenhaut wurde neben Spuren am $\alpha 1$ -CB7 und $\alpha 1$ -CB8 die Hauptmenge der Kohlenhydrate am $\alpha 1$ -CB5 gefunden. Das $\alpha 1$ -CB5 besitzt einen Hydroxylysinrest, der nach diesen Untersuchungen zu 70-80% mit etwa stöchiometrischen Mengen von Glucose und Galaktose glycosyliert ist. Die später erfolgte Aminosäuresequenzanalyse (Butler 1970) ergab, daß die Sequenz der letzten zwei terminalen Aminosäuren des $\alpha 1$ -CB4 und der ersten vier N-terminalen Aminosäuren des $\alpha 1$ -CB5 mit der des Glycopeptides II (siehe Tab. 11) identisch ist. Eine Zuordnung der Glycopeptide I und III zu bestimmten Bereichen der $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Kette ist bisher noch nicht gelungen.

In eigenen Untersuchungen sollte im Vergleich zur $\alpha 1$ -Kette aus Rattenhaut die Menge und der Typ der Kohlenhydrate sowie deren Lokalisierung in den einzelnen CB-Peptiden der $\alpha 1$ -Kette aus Kalbhautkollagen bestimmt werden. Darüber hinaus sollten diese Untersuchungen auch auf die $\alpha 2$ -Kette aus Kalbs- und Rattenhautkollagen ausgedehnt werden, von denen bisher noch nichts bekannt war.

2. Kohlenhydratgehalt von Kalbs- und Rattenhautkollagen

Da die Spaltung am Methionin mit BrCN in 0,1 n HCl (pH 1,5) durchgeführt wird, mußte zuerst geprüft werden, ob unter diesen Bedingungen eine Spaltung glycosidischer Bindungen auftritt. Daher wurden Kohlenhydrat-Analysen vor und nach der Spaltung mit BrCN durchgeführt. Da keine Veränderung des Kohlenhydrat-Gehalts festgestellt wurde, kann eine Spaltung glycosidischer Bindungen ausgeschlossen werden. Die in den Tabellen 12,13 und 14 angegebenen Daten sind Mittelwerte aus drei oder mehr Bestimmungen. Für die Untersuchungen wurden Peptide aus Aufarbeitungen verschiedener Kalbshäute bzw. verschiedener Gruppen von Ratten benutzt.

a) Kohlenhydratgehalt der $\alpha 1$ -Kette von Kalbshautkollagen

Alle CB-Peptide* der $\alpha 1$ -Kette (Rauterberg und Kühn 1971) wurden mit der Anthronmethode auf deren Gehalt an Kohlenhydrat getestet. Im $\alpha 1$ -CB5 wurden immer Kohlenhydrate gefunden. In einem einzigen Fall konnten Spuren von Kohlenhydrate auch in $\alpha 1$ -CB8 nachgewiesen werden. Die quantitative Bestimmung der Hydroxy-lysin-gebundenen Kohlenhydrate im $\alpha 1$ -CB5 und $\alpha 1$ -CB8 erfolgte mit der Methode der alkalischen Hydrolyse (Versuch 14). Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt Tab. 12.

Tab. 12: Kohlenhydratgehalt von $\alpha 1$ -CB5 (Angaben in Mol pro Peptid)

	Glc-Gal-Hyl	Gal-Hyl	Hyl frei	KH-gebundenes Hyl + KH-freies Hyl
$\alpha 1$ -CB5	0,28	0,29	0,42	0,99

* Die Peptide wurden von Dr. Rauterberg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Da $\alpha 1$ -CB5 nur einen Hydroxylysinrest enthält, bedeuten 0,42 Mol freies Hydroxylysin pro Mol Peptid eine etwa 60-prozentige Glycosylierung. Das Mono- und das Disaccharid liegen ungefähr im äquimolaren Verhältnis vor. Da im $\alpha 1$ -CB8 Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl nur in Spuren vorhanden sind, war eine quantitative Auswertung nicht möglich.

b) Kohlenhydratgehalt der $\alpha 2$ -Kette von Ratten- und Kalbshautkollagen

Von der $\alpha 2$ -Kette und ihren CB-Peptiden (Fietzek und Piez 1969) stand relativ wenig Material zur Verfügung. Daher wurde der Kohlenhydratgehalt nur mit der Methode der alkalischen Hydrolyse bestimmt. Die drei kleinen CB-Peptide ($\alpha 2$ -CB1, $\alpha 2$ -CB0 und $\alpha 2$ -CB2) enthalten kein Hydroxylysin und wurden daher nicht in die Untersuchungen mit einbezogen.

Tab. 13: Kohlenhydratgehalt der $\alpha 2$ -Kette aus Rattenhautkollagen (Angaben in Mol pro Mol Peptid)

	$\alpha 2$	$\alpha 2$ -CB4	$\alpha 2$ -CB3	$\alpha 2$ -CB5	$\alpha 2$ -CB3,5 ^{a)}
Hyl gesamt ^{b)}	9,5	3,7	2,4	2,8	5,2
Gal-Hyl ^{c)}	2,1	1,5	0,3	0,4	0,6
Glc-Gal-Hyl ^{c)}	-	-	-	-	-
Hyl frei ^{c)}	7,1	2,2	2,1	2,3	4,6

a) Doppelpeptid aus $\alpha 2$ -CB3 und $\alpha 2$ -CB5 mit einem ungespaltenen Methionin

b) nach saurer Hydrolyse

c) nach alkalischer Hydrolyse

Wie Tab. 13 zeigt, sind von den 9,5 Hydroxylysinresten * der $\alpha 2$ -Kette aus Rattenhautkollagen 2,1 glycosyliert, und zwar ausschließlich zu Gal-Hyl. Die Summe der für die einzelnen CB-Peptide gefundenen Werte ist in guter Übereinstimmung mit dem der gesamten $\alpha 2$ -Kette. Auch der Wert für das Doppelpeptid $\alpha 2$ -CB3,5, das noch ein ungespaltenes Methionin enthält, ist mit der Summe aus den Peptiden $\alpha 2$ -CB3 und $\alpha 2$ -CB5 fast identisch.

In Tab. 14 ist das Ergebnis der Untersuchungen an der $\alpha 2$ -Kette und ihren CB-Peptiden $\alpha 2$ -CB4 und $\alpha 2$ -CB3,5 aus Kalbshautkollagen (Fietzek et al. 1970) dargestellt.

Tab. 14: Kohlenhydratgehalt der $\alpha 2$ -Kette aus Kalbshautkollagen
(Angaben in Mol pro Mol Peptid)

	$\alpha 2$	$\alpha 2$ -CB4	$\alpha 2$ -CB3,5 a)
Hyl gesamt b)	11	4	7
Gal-Hyl c)	2,3	1,2	0,8
Glc-Gal-Hyl c)	0,3	0,6	-
Hyl frei c)	8,7	2,2	6,2

a) Kalbshautkollagen besitzt in diesem Bereich der $\alpha 2$ -Kette kein Methionin

b) nach saurer Hydrolyse

c) nach alkalischer Hydrolyse

Von den 11 Hydroxylysinresten der $\alpha 2$ -Kette sind 2,6 glycosyliert. Anders als im Falle des Rattenhautkollagens wurde hier außer

* Über die partielle Hydroxylierung des Lysins siehe Butler (1968).

dem Monosaccharid auch das Disaccharid nachgewiesen. Die Summe der Werte der einzelnen Peptide ist in guter Übereinstimmung mit dem der gesamten $\alpha 2$ -Kette. Eine Lokalisierung der hydroxylysingebundenen Kohlenhydrate in der $\alpha 2$ -Kette bzw. den CB-Peptiden erfordert eine Fragmentierung dieser Peptide in kleinere, definierte Bruchstücke. Für das $\alpha 2$ -CB4 ist dies zuerst versucht worden. Nach Behandlung mit Chymotrypsin wurden fünf Peptide erhalten. Zwei dieser fünf Peptide enthalten Hyl-gebundene Kohlenhydrate. In diesen Peptiden wurden sowohl Glc-Gal-Hyl als auch Gal-Hyl gefunden. Die Zuordnung der fünf chymotryptischen Peptide entlang der Peptidkette des $\alpha 2$ -CB4 ist noch nicht abgeschlossen. Da eines der Peptide Kohlenhydrate und Homoserin enthält, muß es daher am Kohlenstoff-terminalen Ende des $\alpha 2$ -CB4 lokalisiert sein. Über die Verteilung der Hydroxylysinreste in $\alpha 2$ -CB3,5 ist bisher fast noch nichts bekannt, so daß vorerst auch nur eine grobe Lokalisierung des Kohlenhydrat-Anteils möglich ist.

3. Diskussion

Der Gehalt an Kohlenhydraten in der $\alpha 1$ -Kette des Kalbshautkollagens ist dem der Ratte sehr ähnlich. Die Untersuchung der einzelnen CB-Peptide ergab, daß wie im Falle der Ratte praktisch die gesamte Menge im $\alpha 1$ -CB5 lokalisiert ist. Mono- und Disaccharid wurde in etwa äquimolarem Verhältnis gefunden. Die früher beschriebene, in der $\alpha 1$ -Kette aus Rattenhautkollagen lokalisierte Sequenz des Glycopeptides II wird auch in der $\alpha 1$ -Kette aus Kalbshautkollagen im gleichen Bereich zwischen $\alpha 1$ -CB4 und $\alpha 1$ -CB5 gefunden (Fietzek et al., in Vorbereitung). Aus dem Vorkommen des Glycopeptides II in vielen Species könnte auf eine Abhängigkeit der das Glycopeptid synthetisierenden Enzyme von der Aminosäuresequenz dieses speziellen Bereiches geschlossen werden. Die in Spuren gefundenen Glycosylierung von $\alpha 1$ -CB7 und $\alpha 1$ -CB8

aus Rattenhautkollagen konnte beim Kalbshautkollagen nur am $\alpha 1$ -CB8 gezeigt werden. Daten von anderen Species und Geweben sind nötig, um eine Aussage über die Bedeutung dieses Befundes machen zu können.

Für die $\alpha 2$ -Kette aus Kalbs- und Rattenhautkollagen und deren CB-Peptide wurde ein sehr ähnlicher Grad der Glycosylierung nachgewiesen. In beiden Kollagenen sind die Kohlenhydrate überwiegend an $\alpha 2$ -CB4 gebunden. Glc-Gal-Hyl wurde nur in der $\alpha 2$ -Kette aus Kalbshautkollagen nachgewiesen. Da für diese Untersuchungen Ratten- bzw. Kalbshautpräparationen verschiedener Individuen verwendet wurden, kann die Abwesenheit von Glc-Gal-Hyl in der Ratte als signifikanter Unterschied der beiden Species betrachtet werden. Da in $\alpha 2$ -CB4 1,5 bzw. 1,7 (Mol/Mol Peptid) Hydroxylysin-gebundene Kohlenhydrate gefunden wurden, muß man annehmen, daß mindestens 2 Hydroxylysinreste glycosyliert sind. Bei der Untersuchung der chymotryptischen Peptide von $\alpha 2$ -CB4 aus Kalbshautkollagen wurden, wie erwartet, in 2 Peptiden Kohlenhydrate gefunden. Die Summe des Kohlenhydrat-Anteils von $\alpha 2$ -CB3 und $\alpha 2$ -CB5 aus Rattenhautkollagen entspricht dem Kohlenhydrat-Anteil von $\alpha 2$ -CB3,5 aus Kalbshautkollagen. Daraus könnte geschlossen werden, daß auch im Falle des $\alpha 2$ -CB3,5 mindestens zwei Hydroxylysinreste glycosyliert sind. Insgesamt kann daher mit mindestens vier glycosylierbaren Hydroxylysinresten gerechnet werden.

Aus den vorliegenden Daten ersieht man, daß in der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette in beiden Species der Grad der Glycosylierung zum C-terminalen Ende der Peptidkette abnimmt. Die biologische Bedeutung dieses Befundes ist noch nicht verständlich und läßt Raum für viele Spekulationen über die Regulation der Glycosylierung während der Biosynthese offen.

Die bis jetzt bekannten Aminosäuresequenzen des Kollagens lassen auf eine beträchtliche Homologie der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Ketten schließen. Im $\alpha 2$ -CB4 sind zwei Hydroxylysinreste glycosyliert und dieses

Peptid ist im gleichen Teil des Kollagenmoleküls lokalisiert wie das $\alpha 1$ -CB5 und $\alpha 1$ -CB8 (Butler, 1970), die auch glycosyliert sind. Daher wäre es möglich, daß die Glycosylierung jeweils an den gleichen Bereichen in der $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Kette erfolgt.

Die Frage nach der Funktion der hydroxylysingebundenen Kohlenhydrate in den einzelnen Kollagenen wurde schon in der Diskussion zu Teil A angeschnitten. So könnte die Glycosylierung "ungeeigneter Hydroxylysine" Kollagenmoleküle bilden, die nur an der Peripherie einer Fibrille Platz finden und somit je nach Häufigkeit die Fibrillengröße der einzelnen Gewebe kontrollieren würde (Cunningham und Mitarbeiter, 1970). Eine gewisse Unterstützung dieser Annahme wird in dem Befund gesehen, daß Kollagene mit einem geringen Kohlenhydratgehalt dicke Fibrillen bilden, während Kollagene mit einem hohen Kohlenhydratanteil, wie z.B. Membran- und Invertebratenkollagene nur dünne Fibrillen zu bilden vermögen (Spiro 1969 und eigene Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe).

Unklarheit besteht auch in der Frage des Auftretens von Di- und Monosacchariden in den verschiedenen Kollagenen. In Kollagenen mit der Struktur $(\alpha 1)_2\alpha 2$ werden in wechselndem Verhältnis sowohl Mono- als auch Disaccharid gefunden. Anders bei Kollagen des Typs $(\alpha 1)_3$ (Membran, Invertebraten), wo bisher nur das Disaccharid nachgewiesen worden ist.

Über die katabolischen Veränderungen der Hydroxylysin-gebundenen Kohlenhydrate ist wenig bekannt. Aus ersten Untersuchungen von Cunningham und Mitarbeitern (1967) weiß man, daß im Harn Abbaupptide des Kollagens gefunden werden, die Hydroxylysin-gebundene Kohlenhydrate enthalten.

EXPERIMENTELLER TEIL

Versuch 1

Präparation der Kollagene

Lit.: Nordwig und Hayduk (1969); Hieber (1970)

Puffer: 0,05 m Citratpuffer (pH 3,7)
10,5 g Citronensäure werden in 100 ml 1 n NaOH
und 50 ml 1 n HCl gelöst, und dann auf 1000 ml
mit Aqua dest. aufgefüllt.

KCl-Phosphatpuffer

7,12 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ und 500 g KCl werden in
2 Liter Aqua dest. gelöst.

a) Actinocol-PLK

Gewebe: Die von allen Pigmentdichten befreite, homogenisierte Mesogloea von ungefähr 100 Actinien wird dreimal mit 0,05 m Citratpuffer (pH 3,7) extrahiert und anschließend gegen 1 % HAC dialysiert.

Pepsinabbau: Das in 3 Liter 1 % Essigsäure suspendierte Gewebe wird 40 Stunden bei 10°C unter ständigem Rühren mit Pepsin im Verhältnis Kollagen : Pepsin = 100 : 1 inkubiert.

Kollagen-isolierung: Der Ansatz wird mit 1 % Essigsäure auf 5 Liter verdünnt und bei 12 000 Upm zentrifugiert (Zentrifuge: Sorvall RC-2B der Fa. Sorvall Inc., Rotortyp GSA). Der Überstand wird gegen KCl-Phosphatpuffer dialysiert, das ausgefallene Actinocol-PLK mit der Kühlzentrifuge, Rotortyp SS 34, bei 40 000 Upm absedimentiert. In 0,05 m Citratpuffer (pH 3,7)

wird erneut gelöst und gegen Leitungswasser im Kühlraum dialysiert. Dieser Vorgang wiederholt sich, bis der Reinheitsfaktor 1,8 (N/4-Hyp) beträgt. Dieser Faktor wird nach der von Nordwig und Hayduk (1969) angegebenen Methode bestimmt.

b) Fasciocol-PLK

Gewebe: Etwa 250 Leberegel, mit Aqua dest. bei 4°C von Gallenfarbstoffen sauber gewaschen, dann homogenisiert und dreimal mit 0,05 m Citratpuffer extrahiert (pH 3,7).

Pepsinabbau: Der gegen 1 % Essigsäure dialysierte Citratpufferrückstand wird in 2 Liter 1 % HAC suspendiert und unter ständigem Rühren bei 10°C mit Pepsin im Verhältnis Kollagen : Pepsin = 100 : 1 inkubiert.

Kollagen-isolierung: Der Ansatz wird ohne Verdünnen in der Sorvall (12 000 Upm) abzentrifugiert. Die Reinigung des Fasciocols erfolgt durch Umfällen im Citratpuffer-Leitungswasser-System, bis der Reinheitsfaktor von 1,45 erreicht ist.

c) Helicol-Gelatine

Gewebe: Der von den Pigmentschichten befreite, mit 0,5 m Natriumacetat-Lösung gewaschene, homogenisierte Fuß der Gartenschnecke.

Methode: In ein Corex-Glas werden zu 2 g Homogenat (Feuchtgewicht) 10 ml einer 5 % TCA gegeben; dann wird 30 Minuten lang auf dem Wasserbad bei 100°C gehalten und anschließend zentrifugiert (Sorvall, Rotor SS 34, 15 min bei 20 000 Upm). Der Rückstand

wird ein zweites Mal mit 5 ml 5 % Trichloressigsäure und anschließend nochmals mit 2,5 ml 5 % TCA der Gelatinisierung unterworfen. Die vereinigten Überstände werden 24 Stunden gegen Leitungswasser und 12 Stunden gegen Aqua dest. dialysiert. Die Gelatinelösung wird nun klar zentrifugiert (30 min bei 48 000 Upm) und gefriergetrocknet. Der Reinheitsfaktor betrug 1,7.

Versuch 2

Säurehydrolysen zur Abspaltung proteingebundener Kohlenhydrate

Lit: Spiro (1966); Hörmann und Gollwitzer (1962)

a) für Pentosen

5-8 mg Kollagen bzw. Gelatine werden mit 4 ml einer 0,1 n HCl in zugeschmolzenen Reagensgläsern 6 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Um Cl^- -Ionen, geladene Zucker, Aminosäuren und Peptide zu entfernen, entsalzt man das Hydrolysat an einer Säule aus Dowex 50-X4, 200 - 400 mesh (H^+ -Form), die mit einer Säule aus Dowex 1-X4, 200 - 400 mesh (Formiat als Gegenion) gekoppelt ist.

Als Säulen dienen Pasteurpipetten (Durchmesser 0,7 cm; Füllhöhe des Harzes: 7 cm). Eluat und Waschlösung werden zur Trockne eingeeengt, um die Ameisensäure zu entfernen; dann gibt man 1 ml Aqua dest. hinzu.

b) für Hexosen

α) 5-8 mg Kollagen bzw. Gelatine werden mit 3 ml einer 2 n HCl 4 Stunden in zugeschmolzenen Reagensgläsern bei 100°C hydro-

lysiert. Die Deionisierung wird wie unter a) beschrieben durchgeführt.

- ß) 6 mg Kollagen bzw. Gelatine, in 2 ml einer 0,1 n Essigsäure gelöst, werden in eine Aufschlämmung von 1 g Kationenaustauscher Dowex 50-X8, 200 - 400 mesh (H^+ als Gegenion) gegeben und in einem verschmolzenen Kölbchen 24 Stunden bei $100^{\circ}C$ hydrolysiert. Anschließend wird die durch eine kleine Nutsche abgesaugte Lösung auf 1 ml eingengt.

c) für Hexosamin

4-8 mg Kollagen werden mit 3 ml einer 4 n HCl 6 Stunden bei $100^{\circ}C$ hydrolysiert; die HCl wird am Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in 1 ml Aqua dest. gelöst und auf eine Dowex 50-X8-Säule (Durchmesser 0,5 cm; Harzhöhe: 8 cm) gebracht. Mit 20 ml Aqua dest. wird nachgespült (Eluat verwerfen!), die Hexosamine werden mit 15 ml 2 n HCl wieder eluiert und die HCl am Rotationsverdampfer entfernt.

Versuch 3

Identifizierung der Zucker

a) Papierchromatographie

Papier: Schleicher und Schüll, 2043 b

Laufmittel: Butanol:Wasser:Pyridin = 3 : 2 : 1,5

Sprühreagens: für Hexosen und Pentosen: 0,1 m p-Anisidinphthalat in 96 % Äthanol; Entwicklung der Flecken 10 Minuten bei $100^{\circ}C$

für Oligosaccharide und reduzierende Zucker:

I 0,1 % Natriummetaperjodat (in H_2O)

II 2,8 g Benzidin in einem Gemisch von 80 ml
96 % Äthanol + 70 ml H_2O + 30 ml Aceton +
1,5 ml 1 n HCl lösen; Chromatogramm mit
Lösung I und, im halbfeuchten Zustand, mit
Lösung II besprühen.

Laufzeit: 24 bis 36 Stunden.

b) Dünnschichtchromatographie

Träger- MN-Cellulosepulver 300 der Fa. Macherey, Nagel
material: & Co.

Trennmethode: Durchlaufende Chromatographie mit der "BN-Kammer"
(Fa. Desaga)

Laufmittel: für Neutralzucker: Essigester:Methanol:Eisessig:
 $H_2O = 6 : 1,5 : 1,5 : 1$
für Hexosamine: Pyridin:Essigester:Wasser:
Eisessig = 5 : 5 : 3 : 1

Laufzeit: 24 Stunden

Sprühreagens: Hexosamine mit Ninhydrinreagens (siehe Versuch 10)
Neutralzucker (siehe Versuch 3a)

Versuch 4

Quantitative Hexosenbestimmung

a) Anthronmethode

Lit.: Hörmann und Gollwitzer (1962)

Reagens: 0,2 g Anthron werden in 100 ml verdünnter H_2SO_4
(500 ml H_2SO_4 konz. + 200 ml H_2O) gelöst. Das
Reagens wird frisch zubereitet und ist nach 40

Minuten zu verwenden.

Methode: 0,1-0,2 mg Kollagen bzw. Gelatine werden mit 1 ml Aqua bidst. und 5 ml Anthronreagens versetzt. Unter häufigem Schütteln wird zehn Minuten lang am siedenden Wasserbad erhitzt. Nach weiteren 35 Minuten bei Zimmertemperatur wird die Lösung gegen eine im Versuch mitgeführte Blindprobe bei 625 und 700 nm gemessen. Die gesuchte Zucker- menge ist der Differenz der Extinktionen propor- tional.
Als Standard dient Glucose (20 - 100 µg/ml)

b) Orcinmethode

Lit.: Winzler (1955)

Reagens: 4 Teile einer 70 % H_2SO_4 und 1 Teil einer 1,6 % wäßrigen Orcinlösung (2 Tage haltbar) werden unter Eiskühlung gemischt.

Methode: 0,1-0,2 mg Kollagen bzw. Gelatine werden mit 1 ml Aqua bidst. und 5 ml Orcinreagens versetzt. Unter häufigem Schütteln wird 15 Minuten lang bei 80°C am Wasserbad erhitzt. Nach 35 min. Stehen bei Raumtemperatur wird bei 540 mµ gegen eine im Versuch mitgeführte Blindprobe gemessen. Als Standard dient Galaktose (20 - 100 µg/ml).

c) Automatische Kohlenhydrat-Bestimmung mit Orcin am Technicon- Auto-Analyzer

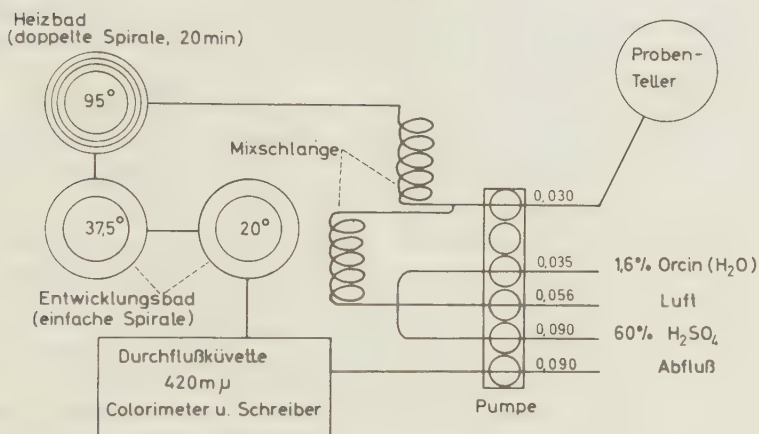
Lit.: modifiziert nach Judd und Cunningham (1962)

Reagens: 1,6 % Orcin in Wasser, 60 % H_2SO_4

Gerät: Technicon-Auto-Analyzer

Empfind- 5 - 70 μg Galaktose/ml ergeben eine Extinktion
lichkeit: 0,04 - 1

Analysenschema:



Durchmesserangaben in Inch, Schläuche von der Fa. Technicon,
Verschlauchung nach der Pumpe aus säurefestem Acidflex-
material. Ansaugvolumen: 0,2 ml.

Versuch 5

Gaschromatographische Analyse proteingebundener Kohlenhydrate

Lit.: modifiziert nach Clamp (1967)

I. Allgemeine Bedingungen

Apparat: Hewlet-Packard, Modell: Scientific 402 High
Efficiency Gas Chromatograph

- Säule: Einmal gewendelte, U-förmige Glassäule (Länge: 250 cm, Durchmesser: 0,32 cm), die mit einer 1 % Lösung von Trimethylchlorsilan (TMS) in Toluol silanisiert wurde.
- Säulenfüllung: 3,8 % SE 30 auf Chromosorb W (80-100 mesh), von Hewlet-Packard nach der "solution coating technique" hergestellt.
1,4 g SE 30 werden in einem 200 ml Rundkolben mit 100 ml Methylenchlorid gelöst; 15 g Chromosorb W (HP) werden dazugegeben. Auf den Kolben wird sofort ein Schliff mit Hahn gesetzt und solange am Vakuum angeschlossen, bis die Luft aus dem Träger entfernt ist. Dann läßt man unter häufigem Schütteln 20 Minuten unter N_2 stehen. Anschließend wird der Ansatz auf eine Glasfritte mit Filterpapier gegeben; sobald das Trägermaterial gut abgetropft ist, wird Vakuum angeschlossen. Das grob vorgetrocknete Material wird in einer großen Petrischale über Nacht mit einem Filterpapier bedeckt und luftgetrocknet, anschließend eine Stunde im Trockenschrank bei $80^{\circ}C$ und nachfolgend eine Stunde im Exsikkator über P_2O_5 belassen.
- Trärgas: Nachgereinigter Stickstoff, Strömungsgeschwindigkeit 50 ml/min.
- Trennbedingungen: $140-200^{\circ}C$ (temperaturprogrammiert; $0,5^{\circ}/min$).

II. Reagentien

- Methanolische HCl: In 200 ml wasserfreies Methanol p.A. wird HCl aus einer Bombe eingeleitet, bis die Gewichtszunahme eine etwa 2-molare Lösung anzeigt. Die genaue Molarität wird durch Titration eines Aliquoten mit

1 n NaOH bestimmt und anschließend mit Methanol auf 1 m eingestellt. Anteile von 50 ml werden gut verschlossen in der Tiefkühltruhe bei -20°C aufbewahrt.

Silylierungs- In ein Gaschromatographie-Derivatisierungs-
gemisch: röhrchen, mit einem teflonbeschichteten Septum verschlossen, werden nacheinander jeweils mit einer neuen 1 ml-Einwegspritze 1 ml Pyridin (p.A. und über CaH_2 im Dunklen aufbewahrt), 0,2 ml Trimethylchlorsilan (TMS) und 0,2 ml Hexamethyldisilazan (HMDS) gegeben.
Derivatröhrchen, TMS und HMDS von der Fa. Serva, Heidelberg.
Das Gemisch ist bei 0°C 3 Tage haltbar und wird vor Gebrauch zentrifugiert. Die für die Untersuchungen benötigten Mengen werden mittels einer 1 ml-Einwegspritze entnommen.

Neutrali- Silbercarbonat
sierungs-
mittel:

Acetylie- Acetanhydrid.
rungsmittel:

III. Methodik

Interner Für die quantitative Bestimmung wird D-Mannit als
Standard: interner Standard benutzt. Hierzu werden geeignete Mengen (0,2 - 1 μMol) in eine Reihe von Reagensgläsern pipettiert, am Rotationsverdampfer getrocknet und als Vorrat im Exsikkator aufgehoben.

Allgemeine 1-4 mg Kollagen, über P_2O_5 getrocknet, werden in
Vorschrift: trockene, Standard-Mannit enthaltende Reagensgläser
eingewogen. Die Reagensgläser werden mit 1,0 ml
1 m meth. HCl beschickt. Anschließend wird 30
Sekunden lang N_2 eingeleitet und der Ansatz nach
dem Zuschmelzen für 18 Stunden in einen Trocken-
schrank mit $100^\circ C$ gestellt. Nach dem Öffnen der
Tubes wird mit Silbercarbonat neutralisiert, bis
die CO_2 -Entwicklung aufhört. Die Reagensgläser
werden nach der Zugabe von 0,1 ml Acetanhydrid
geschüttelt, mit Parafilm verschlossen und 6 Stun-
den bei Raumtemperatur belassen. Nach dem Zentrifu-
gieren wird mit einer Pasteurpipette die Flüssig-
keit in ein kleines, spitzes Plastiktube (Reak-
tionsgefäße 3800 der Fa. Eppendorf) überführt und
am Rotationsverdampfer getrocknet. Der Rückstand
wird erneut in Methanol aufgeschlämmt, zentrifu-
giert und die flüssige Phase in das Tube pipettiert -
insgesamt dreimal. Nun wird die Probe wenigstens
12 Stunden im Vakuumexsikkator über P_2O_5 getrocknet
In das mit Schraubverschluß und Septum versehene
Tube wird 0,1 ml Silylierungsgemisch gespritzt,
kräftig geschüttelt und nach 30 Minuten zentrifu-
giert (NH_4Cl -Niederschlag). Vom Überstand werden
2-8 μl eingespritzt.

Quantitative Für jeden Zucker wird der relative molare Empfind-
Bestimmung: lichkeitsfaktor (MEF) bestimmt. Aus einer Standard-
lösung, die alle in Frage kommenden Monosaccharide
enthält (pro ml 0,5-1 μmol eines Zuckers) werden
Aliquote (0,2-1,2 ml) in Reagensgläser pipettiert,
die D-Mannit in bekannter Menge enthalten, am Rota-
tionsverdampfer getrocknet und wenigstens 12 Stunden
im Vakuumexsikkator über P_2O_5 getrocknet. Nach
Zugabe von 0,5 ml einer 1 m meth. HCl wird, wie

in der allgemeinen Vorschrift angegeben, umgesetzt.

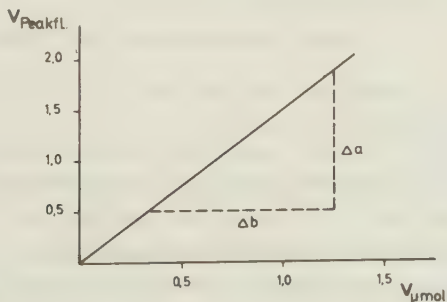
Dem Chromatogramm entnimmt man die totale Peakfläche pro Monosaccharid durch Summierung der Peakflächen der Isomerenpeaks. Die Fläche wird ermittelt durch Multiplikation der Grundlinie in halber Höhe ($g/2$) mit der gesamten Peakhöhe (h).

Das Verhältnis der Gesamtfläche eines Zuckers zur Peakfläche des internen Standards wird gegen das Molverhältnis des Zuckers zum internen Standard aufgetragen. Der molare Empfindlichkeitsfaktor ist dann durch die Steigung der Geraden gegeben.

Berechnung:

$$\begin{aligned} \text{Totale Peakfläche Monosaccharid} &= \text{Peakfläche Monos.} \\ \text{Peakfläche Standard} &= \text{Peakfläche St.} \\ \text{Peakflächenverhältnis } V_{\text{Peakfl.}} &= \frac{\text{Peakfläche Monos.}}{\text{Peakfläche St.}} \\ \\ \mu\text{Mole Monosaccharid} &= \mu\text{Mole Monos.} \\ \mu\text{Mole Standard} &= \mu\text{Mole St.} \\ \text{Molverhältnis } V_{\text{Mole}} &= \frac{\mu\text{Mole Monos.}}{\mu\text{Mole St.}} \end{aligned}$$

Graphische Ermittlung des MEF:



$$MEF = \frac{\Delta a}{\Delta b} = \frac{V_{\text{Peakfl.}}}{V_{\mu\text{Mole}}}$$

Die im Protein vorhandenen μMole Monosaccharid werden nach folgender Formel berechnet:

$$\mu\text{Mole Monos.} = \frac{\text{Peakfl. Monos.}}{\text{Peakfl. St.}} \cdot \frac{\mu\text{Mole St.}}{\text{MEF}}$$

wobei Peakfläche von Monosaccharid und Standard aus dem entsprechenden Chromatogramm entnommen werden.

Da die Einwaage eines Proteins genau bekannt ist, können durch Umrechnung der gemessenen μMole eines Zuckers in mg prozentuale Angaben gemacht werden.

Versuch 6

Proteolytischer Abbau der Invertebratenkollagene

Lit.: Spiro (1967a)

- Proteine: Ichthyocol-SLK, Actinocol-PLK, Fasciocol-PLK, Gelatine aus Helix pomatia
- Enzyme: Rohkollagenase (Worthington Biochemical Corporation, New Jersey)
Pronase, E-Grade (Calbiochem, Los Angeles)
- Puffer: 0,1 m Trisacetat-Puffer (pH 7,4), der 0,005 m Calciumacetat enthält.
- Methodik: In 20 ml Puffer, dem etwas Toluol zugesetzt ist, werden 100 mg Kollagen gelöst und auf einem Magnetrührer bei 37°C mit Kollagenase (0,7 Gew.%) abgebaut. Nach 24 und 48 Stunden erfolgt die Zugabe

von weiteren 0,35 % bzw. 0,10 % Enzym. Nach 72 Stunden wird mit Tris auf pH 7,8 erhöht und 0,4 Gew.% Pronase zugesetzt, nach 96 bis 120 Stunden je weitere 0,1 %; anschließend wird mit Essigsäure auf pH 5,0 gebracht und gefriergetrocknet.

Versuch 7

Gelchromatographie

a) an Sephadex G-50, G-25 und G-15

Lit.: Firmenbroschüre der Fa. Pharmacia, Uppsala/Schweden

Säule: G-50: 2 x 60 cm; Durchfluß im freien Fall 15 ml/h
G-25: 2 x 70 cm; Durchfluß im freien Fall 18 ml/h
G-15: 1,5x130 cm; Durchfluß im freien Fall 12 ml/h
Alle Säulen nach Vorschrift des Herstellers gefüllt.

Puffer: 0,1 m Pyridinacetat (pH 5,6)

Bedingungen: G-50: Die Glycopeptidfraktion I wird in 2 ml Puffer gelöst und aufgetragen. 3 ml Aliquote.

G-25: Die enzymatisch abgebauten Kollagene werden in 10 ml Puffer gelöst. Je 5 ml werden für einen Lauf verwendet. 3 ml-Aliquote.

G-15: Die alkalisch hydrolysierte Glycopeptidfraktion II wird nach dem Neutralisieren am Rotationsverdampfer getrocknet, in 2 ml Puffer gelöst und auf die Säule gebracht. 3 ml Aliquote.

Austesten der Fraktionen: Das Eluat der drei Säulen wird getestet auf
a) Proteingehalt mit Ninhydrin am Technicon-Auto-Analyzer (Standardmethode des Herstellers) und

- b) proteingebundene Kohlenhydrate nach der Orcin-
methode, ebenfalls am Technicon-Auto-Analyzer,
wie unter Versuch 4c angegeben.

b) an P2

Lit.: Vorschrift der Fa. Bio-Rad

Säule: 1,25 x 25 cm; Durchfluß 20 ml/h, mittels einer
Pumpe regulierbar

Elutions-
mittel: 0,1 n Essigsäure

Bedingungen: Das nach Versuch 9 in 5 ml einer 0,1 n Essigsäure
gelöste Kollagen wird auf die Säule gebracht.
Das Eluat wird mittels einer Durchflußküvette im
Spektralphotometer Beckman DB mit Recorder bei
231 m μ gemessen.

Versuch 8

β -Eliminierung und nachfolgende Reduktion

Lit.: Lee und Mitarbeiter (1968;1969)

Glycopeptide: Die Glycopeptidfraktionen I und II der enzyma-
tisch verdauten Invertebratenkollagene

Reagentien: 1 m NaBH₄, gelöst in 0,2 n NaOH; 0,08 m PdCl₂·H₂O
in H₂O

Methodik: Fraktion I bzw. II (etwa 10 μ Mole an Galaktose
enthaltend) werden in 5 ml Aqua dest. gelöst und
zu gleichen Teilen in zwei Hydrolysekölbchen
pipettiert. Das eine dient als Blindprobe, mit dem
anderen wird wie folgt verfahren: Man gibt 2,5 ml

der alkalischen NaBH_4 -Lösung hinzu und läßt bei 45°C etwa 28 Stunden stehen. Nach Zugabe von $0,08 \text{ m PdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ -Lösung läßt man 4 Stunden reagieren und säuert mit Essigsäure an. Die Borsäure wird durch mehrmalige Zugabe von Methanol am Rotationsverdampfer als Borsäuretrimethylester verflüchtigt. Blindprobe und umgesetzte Materialien werden der quantitativen AS-Analyse unterworfen.

Versuch 9

Abspaltung reduzierender Saccharide aus alkalilabilen Glycoproteinen

Lit.: modifiziert nach Lee und Muir (1969)

Protein: Actinocol, Fasciocol, Helicol-Gelatine

Reagentien: $1 \text{ m NH}_2\text{OH}$, auf pH 11,9 eingestellt

Methode: 15 mg Kollagen werden in 20 ml alkalischer Hydroxylaminlösung gelöst; der Ansatz steht 24 Stunden bei 22°C . Die Reaktion wird mit Eisessig auf pH 6,0 gebracht, am Rotationsverdampfer getrocknet, in $0,1 \text{ m}$ Essigsäure gelöst und auf die P2-Säule gebracht (siehe Versuch 7b). Das zwischen Protein- und Salzpeak liegende Eluat wird einrotiert und nach Versuch 3a und 3b auf abgespaltene Zucker getestet.

Versuch 10

Qualitativer Nachweis von Glc-Gal-Hyl und Gal-Hyl

a) Papierchromatographie

Lit.: Spiro (1969)

Papier: Schleicher und Schüll 2043 b oder Whatmanpapier
No. 1 (25 cm breit, 40 cm lang).

Laufmittel: n-Butanol:Essigsäure:Wasser = 4 : 1 : 5

Laufzeit: 70 Stunden

Sprühmittel: 1 g Ninhydrin in einer Mischung von 29 ml 2,4,6-Collidin, 210 ml Eisessig und 700 ml Äthanol
gelöst. Entwicklung der Flecken bei 100°C.

Methodik: Etwa 1 mg entsalztes Kollagenhydrolysat (nach
Versuch 13b) wird in wenig 0,1 m Pyridinacetat
gelöst und als 0,4 cm breiter Strich auf das
Papier gebracht.

b) Hochspannungselektrophorese

Lit.: Moczar und Moczar (1970)

Apparatur: System Wieland, gebaut von Fa. Hölzl

Spannung: 4000 Volt

Laufmittel: Pyridin:Essigsäure:Wasser = 1 : 10 : 89 (pH 3,8)

Papier: Whatmannpapier No. 15 (20 cm breit)

Laufzeit: 120 Minuten

Sprühmittel: wie unter a) angegeben

Methodik: 1 mg alkalisch hydrolysiertes Kollagen (entsalzt

oder mit Salz) wird in 50 μ l Laufmittel gelöst und als 0,5 cm breiter Streifen aufgetragen, etwa 10,5 cm von der Kathode entfernt.

Versuch 11

Ermittlung der Saccharid-Sequenz der Glycopeptidfraktion IIa

a) partielle Säurehydrolyse

Lit.: Spiro (1967b)

Das im Glycopeptidpeak IIa enthaltene Material wird in 3 ml Aqua dest. gelöst; von einem kleinen Teil wird der Hexosegehalt bestimmt (Anthrone methode).

Aliquote, etwa 0,4 (0,1-0,8) μ Mol Hexose enthaltend, werden in sieben kleine Hydrolysekölbchen pipettiert, am Rotationsverdampfer getrocknet und mit 0,5 ml einer 0,1 n HCl versetzt. Nach dem Abschmelzen wird 4,8,12,16 und 24 Stunden lang bei 100°C hydrolysiert und anschließend die HCl am Rotationsverdampfer entfernt. Das sechste Aliquot dient als Blindprobe. In einem siebten Anteil wird mittels der AS-Analyse die μ Mol Menge Glc-Gal-Hyl bestimmt (Versuch 14).

b) Enzymatische Gal- und Glc-Bestimmung

Lit.: Fa. Boehringer, "Enzymatische Analysen für die Lebensmittelchemie"

Galaktose

Reagentien: Puffer: 4,56 g $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ und 1,15 g KH_2PO_4 mit 200 ml Aqua dest. lösen; der pH muß 7,3 betragen.

NAD: 50 mg NAD (Boehringer) in 5 ml Aqua dest. lösen
Enzym: β -Galaktose-Dehydrogenase (Boehringer);

Suspension unverdünnt verwenden.

Meßbedingungen: Temperatur 20-25°C, 1 cm Quarzküvetten, Hitachi-Perkin Elmer 139 UV-VIS Spektrophotometer; Messung bei 340 oder 366 nm gegen Luft.

Methodik: Die getrockneten Proben werden mit 0,25 ml Aqua dest. versetzt. In die Küvette werden 2,6 ml Puffer, 0,1 ml NAD-Lösung und 0,1 ml Probe pipettiert, gemischt und die Extinktion E_1 abgelesen. 0,02 ml Enzym hinzugeben, mischen und nach dem Ende der Reaktion (etwa nach 30 Minuten) Extinktion E_2 ablesen.

Berechnung: Extinktionsdifferenz ΔE_p ($E_2 - E_1$) bilden, davon die Extinktionsdifferenz der Blindprobe (0 Stunden) abziehen: $\Delta E_{Gal} = E_p - E_o$. Für die einzelnen Hydrolysezeiten errechnen sich die abgespaltenen $\mu\text{Mole Gal}$ wie folgt:

$$\mu\text{Mole Gal} = \Delta E_{Gal} \cdot F \cdot 1,375$$

$$F_{340} = 0,479$$

$$F_{366} = 0,905$$

Glucose

Reagentien: Puffer: 11,2 g Triäthanolaminhydrochlorid und 0,2 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ in 150 ml Aqua dest. lösen, mit ca. 5 ml einer 4 n NaOH auf pH 7,6 einstellen; mit Aqua dest. auf 200 ml auffüllen.

NADP- Na_2 : 50 mg in 5 ml Aqua dest. lösen

ATP- Na_2 : 250 mg in 5 ml einer 5 % NaHCO_3 -Lösung lösen.

Enzyme: Hexokinase-Suspension und Glucose-6-phosphat-

Dehydrogenase-Suspension, beide von Boehringer.
Es werden je 0,6 ml Suspension gemischt.

Meßbedin- wie bei Gal
gungen:

Methodik: Die getrockneten Hydrolysen mit 0,25 ml Aqua dest.
auffüllen. In die Küvette werden 3,1 ml Puffer;
0,1 ml NADP-Lösung; 0,1 ml ATP-Lösung und 0,1 ml
Probe pipettiert, gemischt und Extinktion E_1
abgelesen. 0,02 ml des Enzymgemisches hinzugeben,
mischen und nach dem Stillstand der Reaktion
(ca. 10 - 15 Minuten) Extinktion E_2 abgelesen.

Berechnung: Extinktionsdifferenz $\Delta E_p (E_2 - E_1)$ bilden, davon
die Extinktionsdifferenz der Blindprobe (0 Stunden)
abziehen: $\Delta E_{Glc} = \Delta E_p - \Delta E_o$. Für die einzelnen
Hydrolysezeiten errechnen sich die abgespaltenen
 $\mu\text{Mole Glc}$ wie folgt:

$$\begin{aligned}\mu\text{Mole Glc} &= \Delta E_{Glc} \cdot F \cdot 1,375 \\ F_{340} &= 0,495 \\ F_{366} &= 0,933\end{aligned}$$

Versuch 12

Perjodatoxydation von proteingebundenem Hyl

Lit.: Franzblau und Aronson (1967)

Protein: Acinocol-PLK, Fasciocol-PLK, Helicol-Gelatine
(alle gefriergetrocknet)

Reagentien: 0,2 n NaOH; 0,12. m NaJO_4 ; 0,6 n Essigsäure;
Dowex 1-X8 (50-100 mesh; Gegenion:Acetat).

Methodik: In ein kleines Reagensglas (10 ml) werden 2-3 mg Kollagen eingewogen, in 1,6 ml einer 0,2 n NaOH gelöst und nach Zugabe von 1,5 ml einer 0,12 m NaJO_4 -Lösung auf einem Magnetrührer 120 Minuten im Dunklen bei Raumtemperatur gerührt. Die Reaktion wird mit 1 ml 0,6 n Essigsäure gestoppt, das Perjodat durch Zugabe von etwa 600-800 mg Dowexharz entfernt und zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine kleine Säule (Pasteurpipette), gefüllt mit dem gleichen Harz, aufgetragen; nach dem Einsickern wird mit 3 ml Aqua dest. nachgespült. Am Rotationsverdampfer werden Eluat und Waschwasser (oxydierte Kollagene) getrocknet und mit 6 n HCl für die quantitative AS-Analyse hydrolysiert.

Zum Vergleich dient eine Blindprobe, die nur mit Wasser behandelt wurde.

Versuch 13

Proteinhydrolysen

a) mit 6 n HCl

Für die quantitative AS-Analyse werden mindestens 0,2 mg Protein mit 1 ml einer 6 n HCl (über SnCl_2 destilliert) unter Stickstoff 24 Stunden hydrolysiert.

b) mit 2 n NaOH

Qualitative Analysen: Protein wird in Polypropylentubes der Fa. Sorvall (mit Verschuß, siehe Versuch 5) mit 2 n NaOH (0,5 mg/ml) 24 Stunden bei 100°C hydrolysiert. Anschließend wird neutralisiert. Zur Entsalzung wird mit 0,1 n HCl auf pH 2-2,5 eingestellt und auf den Kationenaustauscher Dowex 50-X4 (H^+ -Form)

gebracht (Säule: 0,5 x 8 cm).

Nach gründlichem Waschen mit H_2O werden die Aminosäuren mit 1,5 n NH_4OH (etwa 10faches Säulenvolumen) eluiert; der Ammoniak wird durch Gefriertrocknung entfernt.

Quantitative Analysen: Etwa 1 mg Protein wird in den Eppendorfreaktionsgefäßen (siehe Versuch 5) mit 0,5 ml einer 2 n NaOH versetzt. Der mit einer Nadel durchstochene Deckel wird aufgedrückt. Das Tube wird nun in ein mit 0,5 ml einer 2 n NaOH gefülltes Reagensglas gegeben und unter N_2 verschmolzen. Hydrolyse: 24 Stunden bei $100^{\circ}C$, dann neutralisieren.

Versuch 14

Quantitative Aminosäure-Analyse

a) Bedingungen für die Analyse sauer und alkalisch hydrolysierter Kollagene

Gerät:	Automatischer Analysator BC 200 (Fa. Bio-Cal) gekoppelt mit einem automatischen Probenaufgeber (Fa. Beckman)
Säulenfüllung:	Aminex A6, sphärisches Kationenaustauscherharz (Bio-Rad)
Puffer:	Natriumcitratpuffer, nach der Betriebsanleitung hergestellt
Hydrolysen:	siehe Versuch 10
Auftragsmenge:	Mindestmenge 500 μg Kollagen bei Verwendung der Mikroküvette

Auswertung: Zur Berechnung dient die Analyse eines in seiner Zusammensetzung bekannten Testgemisches

Methodik: Nach der Methode von Spackmann, Stein und Moore (1958) werden die AS mit einem Stufengradienten im Einsäulenverfahren eluiert. Zur Trennung von Phe und Gal-Hyl in alkalisch hydrolysierten Kollagenen gelten die in Klammern angegebenen Laufzeiten der Puffer C und D des folgenden Schemas

Pufferfolge

	A	B	C	D
pH	3,0	3,25	4,25	6,10
Normalität (Na ⁺ -Ionen)	0,2	0,2	0,2	0,35
Laufzeit (Min)	0-11,5	11,5-76	76-113 (76-170)	113-260 (170-290)
Temp. °C	38	38	53	53

b) Verfahren zur quantitativen Berechnung von Glc-Gal-Hyl, Gal-Hyl und freiem Hyl

Zur Berechnung dient die Analyse eines hinsichtlich Zusammensetzung bekannten Testgemisches.

Die prozentualen Mengen von freiem Hyl, Gal-Hyl und Glc-Gal-Hyl im Kollagen oder in mit Bromcyan bzw. enzymatisch gewonnenen Peptiden errechnen sich wie folgt:

$$\% \text{ freies Hyl} = \frac{M \cdot a}{a + b + c} \cdot 100$$

$$\% \text{ Gal-Hyl} = \frac{M \cdot b}{a + b + c} \cdot 100$$

$$\% \text{ Glc-Gal-Hyl} = \frac{M \cdot c}{a + b + c} \cdot 100$$

Hierbei werden die absoluten Mole Hyl (M) nach saurer Hydrolyse, die Mole Hyl frei(a), Gal-Hyl (b) und Glc-Gal-Hyl (c) nach alkalischer Hydrolyse ermittelt. Für die Berechnung der beiden letzteren dient der Anfärbefaktor des freien Hyl (Spiro, 1967b).

Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie bei den Kollagenen niedrig entwickelter Tiere der Kohlenhydratanteil an die Peptidkette des Moleküls gebunden ist. In einem zweiten Teil der Dissertation wurde die Verteilung der Kohlenhydrate von Vertebratenkollagenen auf isolierte, definierte Molekülbruchstücke gemessen.

In einzelnen wurden dabei folgende Ergebnisse erzielt:

- 1) In den Kollagenen der Seeanemone Actinia equina, des Leberegels Fasciola hepatica und der Weinbergschnecke Helix pomatia sind die Hexosen Glucose und Galaktose an die OH-Gruppe der Seitenkette von Hydroxylysin gebunden. Dabei tritt das Disaccharid Glc-Gal-Hyl bei allen drei Kollagenen in weit überwiegender Menge auf. Das Monosaccharid Gal-Hyl ist demgegenüber quantitativ unbedeutend und möglicherweise nur ein Artefakt.
- 2) Bindungen von Kohlenhydraten an Serin, Threonin oder Hydroxyprolin konnten ausgeschlossen werden. Auch sog. Heteropolysaccharide als echte Molekülbestandteile der Invertebratenkollagene sind sehr unwahrscheinlich.
- 3) Es wurde ein ionenaustauscher-chromatographisches Verfahren ausgearbeitet, das nach alkalischer Hydrolyse eine rasche und quantitativ sehr zuverlässige Bestimmung der beiden Hydroxylysin-Saccharide neben freiem Hydroxylysin gestattet. Die Methode ist allen bisherigen Verfahren ähnlicher Zielsetzung weit überlegen. Damit ist eine Möglichkeit für Serienbestimmungen ebenso gegeben wie, besonders, für vergleichende Untersuchungen über das Glycoprotein Kollagen.

- 4) Eine in der Literatur beschriebene, gaschromatographische Methode zur Kohlenhydratanalyse von Glycoproteinen wurde in modifizierter Form auf die Invertebratenkollagene angewendet. Das Verfahren liefert sehr genaue Werte, ist sehr empfindlich und damit auch bei extrem niedrigen Kohlenhydratanteilen einzusetzen. Es ist den bekannten kolorimetrischen Bestimmungsmethoden für Kohlenhydrate auch deswegen vorzuziehen, weil es qualitative und quantitative Aussagen in einem einzigen Analysenschritt erlaubt.
- 5) Durch Bromcyanspaltung gewonnene, reine Peptide der Hautkollagene von Ratte und Kalb wurden auf ihren Zuckergehalt untersucht. In der $\alpha 2$ -Kette beider Wirbeltierkollagene wurde in krassem Gegensatz zu den Invertebratenkollagenen - praktisch ausschließlich das Hyl-Monosaccharid, also Gal-Hyl, gefunden, während in der $\alpha 1$ -Kette des Kalbskautkollagens Mono- und Disaccharid in etwa gleichen Mengen vorkommen. In allen Fällen ist die Kohlenhydratkomponente auf sehr wenige Bruchstücke konzentriert.

Die gewonnenen Ergebnisse werden diskutiert im Hinblick auf die Evolution des Kollagens, auf eine mögliche Differenzierung seiner Funktion und auf eine Beeinflussung der Ausbildung der räumlichen Strukturen des Kollagens durch die Kohlenhydratkomponenten.

LITERATURVERZEICHNIS

- Bailey, A.J., L.J. Fowler und C.M. Peach in "Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix", herausg. von E.A. Balazs, Vol. 1, 385 (1970)
- Bailey, A.J., FEBS Letters 18, 154 (1971)
- Bornstein, P., A.H. Kang, K.A. Piez, Biochemistry 5, 3803 (1966)
- Butler, W.T., Science 161, 796 (1968)
- Butler, W.T., Biochemistry 9, 44 (1970)
- Chambers, R.E. und J.R. Clamp, Biochem.J. 125, 1009 (1971)
- Clamp, J.R. G. Dawson und L. Hough, Biochem.Biophys. Acta 148, 342 (1967)
- Clamp, J.R., T. Bhatti und R.E. Chambers, Biochem.Biophys. Acta 222, 339 (1970)
- Cunningham, L.W. und W.T. Butler, J.Biol.Chem. 241, 3882 (1966)
- Cunningham, L.W., J.D. Ford und J.P. Segrest, J.Biol.Chem. 242, 2570 (1967)
- Cunningham, L.W., P.H. Morgan, H.G. Jacobs und Segrest, J.P. J.Biol.Chem. 245, 5042 (1970)
- Fietzek, P. und K.A. Piez Biochemistry 8, 2129 (1969)
- Fietzek, P., M. Münch, D. Breitzkreuz und K. Kühn, FEBS Letters 9, 229 (1970)
- Franzblau, C. und G. Aronson, J.Biol.Chem. 242, 809 (1967)
- Gottschalk, A., V.P. Bhavanandan und R. Carubelli, Biochim. Biophys. Acta 101, 67 (1965)
- Graßmann, W. und H. Schleich, Biochem.Z. 277, 320 (1935)
- Gross, J., Comp. Biochem. 30, 295 (1958)
- Hieber, E., Diss.Univ.München 1970
- Hörmann H. und G. Fries, Z.Physiol.Chem. 311, 19 (1958)
- Hörmann, H. und R. Gollwitzer, Liebigs Ann.Chemie, 655, 178 (1962)

- Hörmann, H. und J.A. Siddiqui, Liebigs Ann.Chem. 714, 174 (1968)
- Judd, J. und L.W. Cunningham, Anal.Biochem. 4, 512 (1962)
- Katzmann R.L. und A.L. Oronsky, J.Biol.Chem. 246, 5107 (1971)
- Kefalides, N.A., Biochemistry 7, 3103 (1968)
- Kefalides, N.A., Biochem.Biophys.Research Com. 45, 226 (1971)
- Kefalides, N.A. und L.F. Knott, Biochim.Biophys. Acta 203, 62 (1969)
- Kühn, K., G. Schuppler und J. Kühn, Z.Physiol.Chemie 338, 10 (1964)
- Lampert, D.T., Biochemistry 8, 1155 (1969)
- Lee, Y.C. und D. Lang, J.Biol.Chem. 243, 677 (1968)
- Lee, Y.C. und L. Muir, J.Biol.Chem. 244, 2343 (1969)
- Lee, Y.C. und L. Muir, J.Biol.Chem. 245, 502 (1970)
- Miller, E.J., Biochemistry 10, 1652 (1971)
- Moczar E. und M. Moczar, J.Chromatog. 51, 277 (1970)
- Nordwig, A. und U. Hayduk, J.Mol.Biol. 44, 161 (1969)
- Piez, K.A., Ann.Rev.Biochem. 37, 547 (1968)
- Pikkarainen, J. und E. Kulonen, Scand.J.Clin.Lab.Invest.Suppl. 95, 40 (1967)
- Pikkarainen, J. und E. Kulonen, Nature 233, 839 (1969)
- Pikkarainen, J., K. Lampiaho, T. Nikkari, J. Kärkkäinen und E. Kulonen, J.Chromatog. 64, 211 (1972)
- Prockop, D.J., in "Chemistry and Molecular Biology of the Inter-cellular Matrix", herausg. von Balazs, E.A., Vol.1 335 (1970)
- Ramachandran, G.N. und V. Sasisekharan, Nature 190, 1004 (1961)
- Rauterberg, J. und K. Kühn, Eur.J.Biochem. 19, 398 (1971)
- Rich, A. und F.H.C. Crick, J.Mol.Biol. 3, 483 (1961)
- van Slyke, D.D., A. Hiller, D.A. Mac Fadyen, A.B. Hastings und F.W. Klemperer, J.Biol.Chem. 133, 287 (1940)

- Spackmann, D.H., W.H. Stein, S. Moore, Anal.Chem. 30, 1190 (1958)
- Spiro, R.G. und M.J. Spiro, J.Biol.Chem. 246, 4899 (1971a)
- Spiro, R.G. und M.J. Spiro, J.Biol.Chem. 246, 4910 (1971b)
- Spiro, R.G. und M.J. Spiro, J.Biol.Chem. 246, 4919 (1971c)
- Spiro, R.G., Meth. in Enzymol. 8, 3 (1966)
- Spiro, R.G., J.Biol.Chem. 242, 1923 (1967a)
- Spiro, R.G., J.Biol.Chem. 242, 4813 (1967b)
- Spiro, R.G., J.Biol.Chem. 244, 602 (1969)
- Spiro, R.G., Ann.Rev.Biochem. 39, 599 (1970)
- Spiro, R.G. und P.J. Beisswenger, Science 168, 596 (1970)
- Traub, W. und K.A.Piez, Advances in Protein Chemistry, Vol. 25, 1243 (1971)
- Winzler, R.J., Meth. of Biochem. Anal. 2, 290 (1955)
- Yemm, E.W. und A.J. Willis, Biochem.J. 57, 508 (1954)

A B K Ü R Z U N G E N

Fuc	Fucose
Gal	Galaktose
Glc	Glucose
HAC	Essigsäure
HDMS	Hexamethyldisilazan
Hyl	Hydroxylysin
KH	Kohlenhydrate
m	molar
Man	Mannose
n	normal
NLK	Neutralsalzlösliches Kollagen
PLK	Pepsinlösliches Kollagen
SLK	Säurelösliches Kollagen
TCA	Trichloressigsäure
TMS	Trimethylchlorsilan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Xyl	Xylose

ERLÄUTERUNGEN ZUR NOMENKLATUR:

Actinocol	Kollagen der Seeanemone	<u>Actinia equina</u>
Fasciocol	Kollagen des Leberegels	<u>Fasciola hepatica</u>
Helicol	Kollagen der Weinbergschnecke	<u>Helix pomatia</u>

LEBENS LAUF

Am 29.4.1944 wurde ich als Sohn des Maschinenbau-Ingenieurs Franz Stemberger und seiner Ehefrau Elisabeth in München geboren.

Nach dem Besuch der Volksschule (1950 - 1954) trat ich in die Luitpold-Oberrealschule in München ein und legte dort im Juli 1964 die Reifeprüfung ab.

Universitätsstudium

1964-1966 Studium der Chemie an der Universität München

1966-1969 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität München
Vorexamen : Oktober 1967
Staatsexamen: Juli 1969

Von Oktober 1969 bis Dezember 1971 arbeitete ich experimentell am Max-Planck-Institut für Eiweiß- und Lederforschung an der vorliegenden Dissertation.

Ich besitze die deutsche Staatsangehörigkeit.

